

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

TRANTE DE CONCERNATION EN MATIERE DE REVETS

PCT

NOTIFICATION D'ELECTION
(règle 61.2 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

Assistant Commissioner for Patents
 United States Patent and Trademark
 Office
 Box PCT
 Washington, D.C.20231
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE

en sa qualité d'office élu

Date d'expédition (jour/mois/année) 09 octobre 2000 (09.10.00)
Demande internationale no PCT/FR00/00427
Date du dépôt international (jour/mois/année) 21 février 2000 (21.02.00)
Déposant MARCIACQ, Florence etc

Référence du dossier du déposant ou du mandataire
B 13405.3MDT

Date de priorité (jour/mois/année)
22 février 1999 (22.02.99)

1. L'office désigné est avisé de son élection qui a été faite:

dans la demande d'examen préliminaire international présentée à l'administration chargée de l'examen préliminaire international le:

10 août 2000 (10.08.00)

dans une déclaration visant une élection ultérieure déposée auprès du Bureau international le:

2. L'élection a été faite

n'a pas été faite

avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité ou, lorsque la règle 32 s'applique, dans le délai visé à la règle 32.2b).

Bureau international de l'OMPI
34, chemin des Colombettes
1211 Genève 20, Suisse
no de télecopieur: (41-22) 740.14.35

Fonctionnaire autorisé
Henrik Nyberg
no de téléphone: (41-22) 338.83.38

THIS PAGE BLANK (USPTO)

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DES REVETS

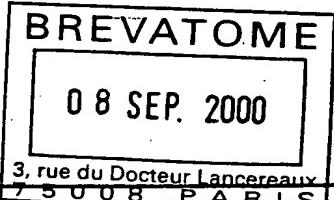
PTO/PCT Rec'd 22 AUG 2001

PCT

AVIS INFORMANT LE DEPOSANT DE LA COMMUNICATION DE LA DEMANDE INTERNATIONALE AUX OFFICES DESIGNES

(règle 47.1.c), première phrase, du PCT)

Date d'expédition (jour/mois/année) 31 août 2000 (31.08.00)	Destinataire: DES TERMES, Monique Brevatome 3, rue du Docteur Lancereaux F-75008 Paris FRANCE	
Référence du dossier du déposant ou du mandataire B 13405.3MDT	AVIS IMPORTANT	
Demande internationale no PCT/FR00/00427	Date du dépôt international (jour/mois/année) 21 février 2000 (21.02.00)	Date de priorité (jour/mois/année) 22 février 1999 (22.02.99)
Déposant COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE etc		



- Il est notifié par la présente qu'à la date indiquée ci-dessus comme date d'expédition de cet avis, le Bureau international a communiqué, comme le prévoit l'article 20, la demande internationale aux offices désignés suivants:

US

Conformément à la règle 47.1.c), troisième phrase, ces offices acceptent le présent avis comme preuve déterminante du fait que la communication de la demande internationale a bien eu lieu à la date d'expédition indiquée plus haut, et le déposant n'est pas tenu de remettre de copie de la demande internationale à l'office ou aux offices désignés.

- Les offices désignés suivants ont renoncé à l'exigence selon laquelle cette communication doit être effectuée à cette date:
CA,EP,JP

La communication sera effectuée seulement sur demande de ces offices. De plus, le déposant n'est pas tenu de remettre de copie de la demande internationale aux offices en question (règle 48.1)a-bis).

- Le présent avis est accompagné d'une copie de la demande internationale publiée par le Bureau international le 31 août 2000 (31.08.00) sous le numéro WO 00/50626

RAPPEL CONCERNANT LE CHAPITRE II (article 31.2)a) et règle 54.2)

Si le déposant souhaite reporter l'ouverture de la phase nationale jusqu'à 30 mois (ou plus pour ce qui concerne certains offices) à compter de la date de priorité, la demande d'examen préliminaire international doit être présentée à l'administration compétente chargée de l'examen préliminaire international avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité.

Il appartient exclusivement au déposant de veiller au respect du délai de 19 mois.

Il est à noter que seul un déposant qui est ressortissant d'un Etat contractant du PCT lié par le chapitre II ou qui y a son domicile peut présenter une demande d'examen préliminaire international.

RAPPEL CONCERNANT L'OUVERTURE DE LA PHASE NATIONALE (article 22 ou 39.1))

Si le déposant souhaite que la demande internationale procède en phase nationale, il doit, dans le délai de 20 mois ou de 30 mois, ou plus pour ce qui concerne certains offices, accomplir les actes mentionnés dans ces dispositions auprès de chaque office désigné ou élu.

Pour d'autres informations importantes concernant les délais et les actes à accomplir pour l'ouverture de la phase nationale, voir l'annexe du formulaire PCT/IB/301 (Notification de la réception de l'exemplaire original) et le volume II du Guide du déposant du PCT.

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Col mbettes 1211 Genève 20, Suisse no de télecopieur (41-22) 740.14.35	Fonctionnaire autorisé J. Zahra no de téléphone (41-22) 338.83.38
---	---

THIS PAGE BLANK (USPTO)

TRAITE DE OPERATION EN MATIERE BREVETS

Expéditeur : le BUREAU INTERNATIONAL

PTO/PCT Rec'd 22 AUG 2001

destinataire:

**NOTIFICATION RELATIVE
A LA PRESENTATION OU A LA TRANSMISSION
DU DOCUMENT DE PRIORITE**
(instruction administrative 411 du PCT)

DES TERMES, Monique
Brevatome
3, rue du Docteur Lancereaux
F-75008 Paris
FRANCE

Date d'expédition (jour/mois/année) 24 mars 2000 (24.03.00)
Référence du dossier du déposant ou du mandataire B 13405.3MDT
Demande internationale no PCT/FR00/00427
Date de publication internationale (jour/mois/année) Pas encore publiée
Déposant COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE etc

NOTIFICATION IMPORTANTE

Date du dépôt international (jour/mois/année)
21 février 2000 (21.02.00)

Date de priorité (jour/mois/année)
22 février 1999 (22.02.99)

- La date de réception (sauf lorsque les lettres "NR" figurent dans la colonne de droite) par le Bureau international du document de priorité correspondant à la ou aux demandes énumérées ci-après est notifiée au déposant. Sauf indication contraire consistant en un astérisque figurant à côté d'une date de réception, ou les lettres "NR", dans la colonne de droite, le document de priorité en question a été présenté ou transmis au Bureau international d'une manière conforme à la règle 17.1.a) ou b).
- Ce formulaire met à jour et remplace toute notification relative à la présentation ou à la transmission du document de priorité qui a été envoyée précédemment.
- Un astérisque(*) figurant à côté d'une date de réception dans la colonne de droite signale un document de priorité présenté ou transmis au Bureau international mais de manière non conforme à la règle 17.1.a) ou b). Dans ce cas, l'attention du déposant est appelée sur la règle 17.1.c) qui stipule qu'aucun office désigné ne peut décider de ne pas tenir compte de la revendication de priorité avant d'avoir donné au déposant la possibilité de remettre le document de priorité dans un délai raisonnable en l'espèce.
- Les lettres "NR" figurant dans la colonne de droite signalent un document de priorité que le Bureau international n'a pas reçu ou que le déposant n'a pas demandé à l'office récepteur de préparer et de transmettre au Bureau international, conformément à la règle 17.1.a) ou b), respectivement. Dans ce cas, l'attention du déposant est appelée sur la règle 17.1.c) qui stipule qu'aucun office désigné ne peut décider de ne pas tenir compte de la revendication de priorité avant d'avoir donné au déposant la possibilité de remettre le document de priorité dans un délai raisonnable en l'espèce.

<u>Date de priorité</u>	<u>Demande de priorité n°</u>	<u>Pays, office régional ou office récepteur selon le PCT</u>	<u>Date de réception du document de priorité</u>
22 fevr 1999 (22.02.99)	99/02170	FR	13 mars 2000 (13.03.00)
27 sept 1999 (27.09.99)	99/12001	FR	NR

Bureau international de l'OMPI
34, chemin des Colombettes
1211 Genève 20, Suisse
no de télécopieur (41-22) 740.14.35

Fonctionnaire autorisé:

Yolaine CUSSAC
no de téléphone (41-22) 338.83.38

THIS PAGE BLANK (USPTO)

REQUETE PCT

Original (pourPRESENTATION) - imprimé le 21.02.2000 11:58:29 AM

0	Réserve à l'office récepteur	
0-1	Demande internationale No.	
0-2	Date du dépôt international	
0-3	Nom de l'office récepteur et "Demande internationale PCT"	
0-4	Formulaire - PCT/RO/101 Requête PCT	
0-4-1	Préparé avec	PCT-EASY Version 2.90 (mis à jour 15.10.1999)
0-5	Pétition Le soussigné requiert que la présente demande internationale soit traitée conformément au Traité de coopération en matière de brevets	
0-6	Office récepteur (choisi par le déposant)	Institut national de la propriété industrielle (France) (RO/FR)
0-7	Référence du dossier du déposant ou du mandataire	B 13405.3MDT
I	Titre de l'invention	PROCEDE DE FABRICATION DE MORPHOLINO-NUCLEOTIDES, ET UTILISATION DE CEUX-CI POUR L'ANALYSE ET LE MARQUAGE DE SEQUENCES D'ACIDES NUCLEIQUES
II	Déposant Cette personne est :	Déposant seulement
II-1	Déposant pour	Tous les Etats désignés sauf US
II-2	Nom	COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE
II-4	Adresse:	31-33, rue de la Fédération
II-5		F-75752 PARIS 15ème
II-6	Nationalité (nom de l'Etat)	France
II-7	Résidence (nom de l'Etat)	FR
II-8	No. de téléphone	01 69 08 82 93
II-9	No de télécopieur:	01 69 08 82 92
III-1	Déposant et/ou inventeur Cette personne est :	Déposant seulement
III-1-1		
III-1-2	Déposant pour	Tous les Etats désignés sauf US
III-1-4	Nom	CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
III-1-5	Adresse:	SCIENTIFIQUE 3, rue Michel Ange
		F-75794 PARIS CEDEX 16
III-1-6	Nationalité (nom de l'Etat)	France
III-1-7	Résidence (nom de l'Etat)	FR

THIS PAGE BLANK (USPTO)

III-2	Déposant et/ou inventeur Cette personne est :	Déposant et inventeur US seulement MARCIAcq, Florence 6, rue Gambetta F-13580 LA FARE LES OLIVIERS
III-2-1	Déposant pour	
III-2-2	Nom (NOM DE FAMILLE, Prénom)	
III-2-3	Adresse:	
III-2-6	Nationalité (nom de l'Etat)	
III-2-7	Résidence (nom de l'Etat)	
III-2-8	FR	FR
III-3	Déposant et/ou inventeur Cette personne est :	Déposant et inventeur US seulement SAUVAIGO, Sylvie
III-3-1	Déposant pour	Le Noyaret
III-3-2	Nom (NOM DE FAMILLE, Prénom)	F-38320 HERBEYS
III-3-3	Adresse:	France
III-3-6	Nationalité (nom de l'Etat)	
III-3-7	Résidence (nom de l'Etat)	
III-3-8	FR	FR
III-4	Déposant et/ou inventeur Cette personne est :	Déposant et inventeur US seulement
III-4-1	Déposant pour	MOURET, Jean-François
III-4-2	Nom (NOM DE FAMILLE, Prénom)	Montée du Pilet
III-4-3	Adresse:	F-38500 COUBLEVIE
III-4-6	Nationalité (nom de l'Etat)	France
III-4-7	Résidence (nom de l'Etat)	
III-4-8	FR	FR
III-5	Déposant et/ou inventeur Cette personne est :	Déposant et inventeur US seulement
III-5-1	Déposant pour	ISSARTEL, Jean-Paul
III-5-2	Nom (NOM DE FAMILLE, Prénom)	9 rue du Fournet
III-5-3	Adresse:	F-38120 SAINT-EGREVE
III-5-6	Nationalité (nom de l'Etat)	France
III-5-7	Résidence (nom de l'Etat)	
III-5-8	FR	FR
III-6	Déposant et/ou inventeur Cette personne est :	Déposant et inventeur US seulement
III-6-1	Déposant pour	MOLKO, Didier
III-6-2	Nom (NOM DE FAMILLE, Prénom)	Les Noyers A1.1
III-6-3	Adresse:	11 avenue de la Gare
III-6-6	Nationalité (nom de l'Etat)	F-38210 TULLINS
III-6-7	Résidence (nom de l'Etat)	France
III-6-8	FR	FR

THIS PAGE BLANK (USPTO)

REQUETE PCT

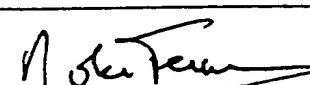
Original (pourPRESENTATION) - imprimé le 21.02.2000 11:58:29 AM

IV-1	Mandataire ; Représentant commun ou adresse pour la correspondance. La personne nommée ci-dessous est/a été désignée pour agir au nom du ou des déposants auprès des autorités internationales compétentes, comme Nom (NOM DE FAMILLE, Prénom)	mandataire
IV-1-1		
IV-1-2	Adresse:	DES TERMES, Monique c/o BREVATOME 3, rue du Docteur Lancereaux F-75008 PARIS France
IV-1-3	No. de téléphone	01 53 83 94 00
IV-1-4	No de télécopieur:	01 45 63 83 33
IV-1-5	Courrier électronique:	spibrev@easynet.fr
V	Désignation d'Etats	
V-1	Brevet régional (d'autres formes de protection ou de traitement, le cas échéant, sont spécifiées entre parenthèses pour les Etats désignés concernés)	EP: AT BE CH&LI CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE et tout autre Etat qui est un Etat contractant de la Convention sur le brevet européen et du PCT
V-2	Brevet national (d'autres formes de protection ou de traitement, le cas échéant, sont spécifiées entre parenthèses pour les Etats désignés concernés)	CA JP US
V-5	Déclaration concernant les désignations de précaution Outre les désignations faites sous les rubriques V-1, V-2 et V-3, le déposant fait aussi, conformément à la règle 4.9.b), toutes les désignations qui seraient autorisées en vertu du PCT, à l'exception de toute désignation(s) indiquée(s) dans la rubrique V-6 ci-dessous. Le déposant déclare que ces désignations additionnelles sont faites sous réserve de confirmation et que toute désignation qui n'est pas confirmée avant l'expiration d'un délai de 15 mois à compter de la date de priorité sera considérée comme retirée par le déposant à l'expiration de ce délai.	
V-6	Exclusion(s) des désignations de précaution	NEANT
VI-1	Revendication de priorité d'une demande nationale antérieure	
VI-1-1	Date du dépôt	22 février 1999 (22.02.1999)
VI-1-2	Numéro	99 02170
VI-1-3	Pays	FR
VI-2	Revendication de priorité d'une demande nationale antérieure	
VI-2-1	Date du dépôt	27 septembre 1999 (27.09.1999)
VI-2-2	Numéro	99 12001
VI-2-3	Pays	FR

THIS PAGE BLANK (USPTO)

REQUETE PCT

Original (pour PRESENTATION) - imprimé le 21.02.2000 11:58:29 AM

VII-1	Administration chargée de la recherche internationale choisie	Office européen des brevets (OEB) (ISA/EP)	
VII-2	Demande d'utilisation des résultats d'une recherche antérieure; mention de cette recherche		
VII-2-1	Date	12 novembre 1999 (12.11.1999)	
VII-2-2	Numéro	FA 576591	
VII-2-3	Pays (ou office régional)	EP	
VIII	Bordereau	Nombre de feuillets	Dossier(s) électronique(s) joint(s)
VIII-1	Requête	5	-
VIII-2	Description	54	-
VIII-3	Revendications	8	-
VIII-4	Abrégé	1	abr-b13405mdt.txt
VIII-5	Dessins	3	-
VIII-7	TOTAL	71	
VIII-8	Eléments joints	Document(s) papier joint(s)	Dossier(s) électronique(s) joint(s)
VIII-10	Feuille de calcul des taxes	✓	-
VIII-10	Copie du pouvoir général	référence n° PG07085	-
VIII-12	Document(s) de priorité	Elément(s) VI-1	-
VIII-16	Disquette PCT-EASY	-	disquette
VIII-17	Autre (préciser):	LISTE DES MANDATAIRES BREVATOME	-
VIII-18	Figure des dessins qui doit accompagner l'abrégué	/	
VIII-19	Langue de dépôt de la demande internationale	français	
IX-1	Signature du déposant ou du mandataire		
IX-1-1	Nom (NOM DE FAMILLE, Prénom)	DES TERMES, Monique	

RESERVE A L'OFFICE RECEPTEUR

10-1	Date effective de réception des pièces supposées constituer la demande internationale	
10-2	Dessins:	
10-2-1	Reçus	
10-2-2	non reçus	
10-3	Date effective de réception, rectifiée en raison de la réception ultérieure, mais dans les délais, de documents ou de dessins complétant ce qui est supposé constituer la demande internationale:	
10-4	Date de réception, dans les délais, des corrections demandées selon l'article 11.2) du PCT	

THIS PAGE BLANK (USPTO)

REQUETE PCT

B 13405.3MDT

Original (pourPRESENTATION) - imprimé le 21.02.2000 11:58:29 AM

10-5	Administration chargée de la recherche internationale	ISA/EP
10-6	Transmission de la copie de recherche différée jusqu'au paiement de la taxe de recherche	

RESERVE AU BUREAU INTERNATIONAL

11-1	Date de réception de l'exemplaire original par le Bureau international	
------	--	--

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT (ANNEXE - FEUILLE DE CALCUL DES TAXES)

Original (pour PRESENTATION) - imprimé le 21.02.2000 11:58:29 AM

(Cette feuille ne fait pas partie de la demande internationale ni ne compte comme une feuille de celle-ci)

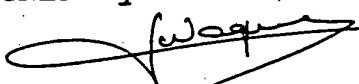
0	Réservé à l'office récepteur Demande internationale No.			
0-2	Timbre à date de l'office récepteur			
0-4	Formulaire - PCT/RO/101 (Annexe) Feuille de calcul des taxes PCT			
0-4-1	Préparé avec	PCT-EASY Version 2.90 (mis à jour 15.10.1999)		
0-9	Référence du dossier du déposant ou du mandataire	B 13405.3MDT		
2	Déposant	COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE, et al.		
12	Calcul des taxes prescrites	Montant total des taxes/multiplicateur	Montant total (FRF)	
12-1	Taxe de transmission T	⇒	400	
12-2	Taxe de recherche S	⇒	6 198.79	
12-3	Taxe internationale Taxe de base (30 premières feuilles) b1	2 682.86		
12-4	Feuilles suivantes	41		
12-5	Montant additionnel (X)	59.04		
12-6	Montant total additionnel b2	2 420.64		
12-7	b1 + b2 = B	5 103.5		
12-8	Taxes de désignation Nombre de désignations indiquées dans la demande internationale	4		
12-9	Nombre de taxes de désignations dues (maximum 10)	4		
12-10	Montant de la taxe de désignation (X)	577.24		
12-11	Montant total des taxes de désignation D	2 308.96		
12-12	Réduction de taxe PCT-EASY R	-826.51		
12-13	Montant total de la taxe internationale (B+D-R) I	⇒	6 585.95	
12-17	TOTAL DES TAXES DUES (T+S+I+P)	⇒	13 184.74	
12-19	Mode de paiement	autorisation de débiter un compte de dépôt		
12-20	Instructions concernant le compte de dépôt L'office récepteur:	Institut national de la propriété industrielle (France) (RO/FR)		
12-20-1	est autorisé à débiter mon compte de dépôt du total des taxes indiqué ci-dessus	✓		

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT (ANNEXE - FEUILLE DE CALCUL DES TAXES)

B 13405.3MDT

Original (pour PRESENTATION) - imprimé le 21.02.2000 11:58:29 AM

12-20-2	est autorisé à débiter mon compte de dépôt de tout montant manquant, ou à le créditer de tout excédent, dans le paiement du total des taxes indiqué ci-dessus	✓
12-21	Compte de dépôt No.	024
12-22	Date	21 février 2000 (21.02.2000)
12-23	Nom et signature	WAGNER Sylvia 

MESSAGES DE VALIDATION ET REMARQUES

13-2-1	Messages de validation Requête	Vert? Le titre de l'invention doit être bref et précis. Prière de vérifier.
13-2-2	Messages de validation Etats	Vert? Il est possible d'effectuer davantage de désignations. Prière de vérifier.
13-2-6	Messages de validation Bordereau	Vert? Priorité 2: Le document de priorité n'est pas joint. (Le déposant doit le fournir dans un délai de 16 mois à compter de la date de priorité la plus ancienne revendiquée)
13-2-8	Messages de validation Paiement	Vert? Prière de vérifier que vous avez bien un compte de dépôt auprès de l'office récepteur.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

TRAITE DE COOPERATION EN MAT

BREVETS

Expéditeur : L'ADMINISTRATION CHARGEÉE DE
LA RECHERCHE INTERNATIONALE

PCT

Destinataire

BREVATOME
A l'att. de Des Termes, Monique
3, rue du Docteur Lancereaux
F-75008 Paris
FRANCE

BREVATOME	
30 JUIN 2000	
3, rue du Docteur Lancereaux 75008 PARIS	

NOTIFICATION DE TRANSMISSION DU
RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE
OU DE LA DECLARATION

(règle 44.1 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire B 13405.3MDT	Date d'expédition (jour/mois/année) 28/06/2000
Demande internationale n° PCT/FR 00/00427	Date du dépôt international (jour/mois/année) 21/02/2000
POUR SUITE A DONNER voir les paragraphes 1 et 4 ci-après	
Déposant COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE et al.	

1. Il est notifié au déposant que le rapport de recherche internationale a été établi et lui est transmis ci-joint.

Dépôt de modifications et d'une déclaration selon l'article 19 :

Le déposant peut, s'il le souhaite, modifier les revendications de la demande internationale (voir la règle 46):

Quand? Le délai dans lequel les modifications doivent être déposées est de deux mois à compter de la date de transmission du rapport de recherche internationale ; pour plus de précisions, voir cependant les notes figurant sur la feuille d'accompagnement.

Où? Directement auprès du Bureau international de l'OMPI
34, chemin des Colombettes
1211 Genève 20. Suisse
n° de télécopieur: (41-22)740.14.35

Pour des instructions plus détaillées, voir les notes sur la feuille d'accompagnement.

2. Il est notifié au déposant qu'il ne sera pas établi de rapport de recherche internationale et la déclaration à cet effet, prévue à l'article 17.2(a), est transmise ci-joint.

3. En ce qui concerne la réserve pouvant être formulée, conformément à la règle 40.2, à l'égard du paiement d'une ou de plusieurs taxes additionnelles, il est notifié au déposant que

la réserve ainsi que la décision y relative ont été transmises au Bureau international en même temps que la requête du déposant tendant à ce que le texte de la réserve et celui de la décision en question soient notifiés aux offices désignés.

la réserve n'a encore fait l'objet d'aucune décision; dès qu'une décision aura été prise, le déposant en sera avisé.

4. **Mesure(s) consécutive(s)** : Il est rappelé au déposant ce qui suit:

Peu après l'expiration d'un délai de **18 mois** à compter de la date de priorité, la demande internationale sera publiée par le Bureau international. Si le déposant souhaite éviter ou différer la publication, il doit faire parvenir au Bureau international une déclaration de retrait de la demande internationale, ou de la revendication de priorité, conformément aux règles 90bis.1 et 90bis.3, respectivement, avant l'achèvement de la préparation technique de la publication internationale.

Dans un délai de **19 mois** à compter de la date de priorité, le déposant doit présenter la demande d'examen préliminaire international s'il souhaite que l'ouverture de la phase nationale soit reportée à 30 mois à compter de la date de priorité (ou même au-delà dans certains offices).

Dans un délai de **20 mois** à compter de la date de priorité, le déposant doit accomplir les démarches prescrites pour l'ouverture de la phase nationale auprès de tous les offices désignés qui n'ont pas été élus dans la demande d'examen préliminaire international ou dans une élection ultérieure avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité ou qui ne pouvaient pas être élus parce qu'ils ne sont pas liés par le chapitre II.

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Fax: (+31-70) 340-3016	Fonctionnaire autorisé Andria Overbeeke-Siepkes
--	---

THIS PAGE BLANK (USPTO)

NOTES RELATIVES AU FORMULAIRE PCT/ISA/220

Les présentes notes sont destinées à donner les instructions essentielles concernant le dépôt de modifications selon l'article 19. Les notes sont fondées sur les exigences du Traité de coopération en matière de brevets (PCT), du règlement d'exécution et des instructions administratives du PCT. En cas de divergence entre les présentes notes et ces exigences, ce sont ces dernières qui prennent. Pour de plus amples renseignements, on peut aussi consulter le Guide du déposant du PCT, qui est une publication de l'OMPI.

Dans les présentes notes, les termes "article", "règle" et "instruction" renvoient aux dispositions du traité, de son règlement d'exécution et des instructions administratives du PCT, respectivement.

INSTRUCTIONS CONCERNANT LES MODIFICATIONS SELON L'ARTICLE 19

Après réception du rapport de recherche internationale, le déposant a la possibilité de modifier une fois les revendications de la demande internationale. On notera cependant que, comme toutes les parties de la demande internationale (revendications, description et dessins) peuvent être modifiées au cours de la procédure d'examen préliminaire international, il n'est généralement pas nécessaire de déposer de modifications des revendications selon l'article 19 sauf, par exemple, au cas où le déposant souhaite que ces dernières soient publiées aux fins d'une protection provisoire ou a une autre raison de modifier les revendications avant la publication internationale. En outre, il convient de rappeler que l'obtention d'une protection provisoire n'est possible que dans certains Etats.

Quelles parties de la demande internationale peuvent être modifiées?

Selon l'article 19, les revendications exclusivement.

Durant la phase internationale, les revendications peuvent aussi être modifiées (ou modifiées à nouveau) selon l'article 34 auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international. La description et les dessins ne peuvent être modifiés que selon l'article 34 auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international.

Lors de l'ouverture de la phase nationale, toutes les parties de la demande internationale peuvent être modifiées selon l'article 28 ou, le cas échéant, selon l'article 41.

Quand?

Dans un délai de deux mois à compter de la date de transmission du rapport de recherche internationale ou de 16 mois à compter de la date de priorité, selon l'échéance la plus tardive. Il convient cependant de noter que les modifications seront réputées avoir été reçues en temps voulu si elles parviennent au Bureau international après l'expiration du délai applicable mais avant l'achèvement de la préparation technique de la publication internationale (règle 46.1).

Où ne pas déposer les modifications?

Les modifications ne peuvent être déposées qu'auprès du Bureau international; elles ne peuvent être déposées ni auprès de l'office récepteur ni auprès de l'administration chargée de la recherche internationale (règle 46.2).

Lorsqu'une demande d'examen préliminaire international a été/est déposée, voir plus loin.

Comment?

Soit en supprimant entièrement une ou plusieurs revendications, soit en ajoutant une ou plusieurs revendications nouvelles ou encore en modifiant le texte d'une ou de plusieurs des revendications telles que déposées.

Une feuille de remplacement doit être remise pour chaque feuille des revendications qui, en raison d'une ou de plusieurs modifications, diffère de la feuille initialement déposée.

Toutes les revendications figurant sur une feuille de remplacement doivent être numérotées en chiffres arabes. Si une revendication est supprimée, il n'est pas obligatoire de renumeroter les autres revendications. Chaque fois que des revendications sont renumerotées, elles doivent l'être de façon continue (instruction 205.b)).

Les modifications doivent être effectuées dans la langue dans laquelle la demande internationale est publiée.

Quels documents doivent/peuvent accompagner les modifications?

Lettre (instruction 205.b)):

Les modifications doivent être accompagnées d'une lettre.

La lettre ne sera pas publiée avec la demande internationale et les revendications modifiées. Elle ne doit pas être confondue avec la "déclaration selon l'article 19.1)" (voir plus loin sous "Déclaration selon l'article 19.1").

La lettre doit être rédigée en anglais ou en français, au choix du déposant. Cependant, si la langue de la demande internationale est l'anglais, la lettre doit être rédigée en anglais; si la langue de la demande internationale est le français, la lettre doit être rédigée en français.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

RELATIVES AU FORMULAIRE PCT/ISA/20 (suit)

La lettre doit indiquer les différences existant entre les revendications telles que déposées et les revendications telles que modifiées. Elle doit indiquer en particulier, pour chaque revendication figurant dans la demande internationale (étant entendu que des indications identiques concernant plusieurs revendications peuvent être groupées), si

- i) la revendication n'est pas modifiée;
- ii) la revendication est supprimée;
- iii) la revendication est nouvelle;
- iv) la revendication remplace une ou plusieurs revendications telles que déposées;
- v) la revendication est le résultat de la division d'une revendication telle que déposée.

Les exemples suivants illustrent la manière dont les modifications doivent être expliquées dans la lettre d'accompagnement:

1. [Lorsque le nombre des revendications déposées initialement s'élevait à 48 et qu'à la suite d'une modification de certaines revendications il s'élève à 51]:
"Revendications 1 à 15 remplacées par les revendications modifiées portant les mêmes numéros; revendications 30, 33 et 36 pas modifiées; nouvelles revendications 49 à 51 ajoutées."
2. [Lorsque le nombre des revendications déposées initialement s'élevait à 15 et qu'à la suite d'une modification de toutes les revendications il s'élève à 11]:
"Revendications 1 à 15 remplacées par les revendications modifiées 1 à 11."
3. [Lorsque le nombre des revendications déposées initialement s'élevait à 14 et que les modifications consistent à supprimer certaines revendications et à en ajouter de nouvelles]:
"Revendications 1 à 6 et 14 pas modifiées; revendications 7 à 13 supprimées; nouvelles revendications 15, 16 et 17 ajoutées." ou
"Revendications 7 à 13 supprimées; nouvelles revendications 15, 16 et 17 ajoutées; toutes les autres revendications pas modifiées."
4. [Lorsque plusieurs sortes de modifications sont faites]:
"Revendications 1-10 pas modifiées; revendications 11 à 13, 18 et 19 supprimées; revendications 14, 15 et 16 remplacées par la revendication modifiée 14; revendication 17 divisée en revendications modifiées 15, 16 et 17; nouvelles revendications 20 et 21 ajoutées."

"Déclaration selon l'article 19.1)" (Règle 46.4)

Les modifications peuvent être accompagnées d'une déclaration expliquant les modifications et précisant l'incidence que ces dernières peuvent avoir sur la description et sur les dessins (qui ne peuvent pas être modifiés selon l'article 19.1)).

La déclaration sera publiée avec la demande internationale et les revendications modifiées.

Elle doit être rédigée dans la langue dans laquelle la demande internationale est publiée.

Elle doit être succincte (ne pas dépasser 500 mots si elle est établie ou traduite en anglais).

Elle ne doit pas être confondue avec la lettre expliquant les différences existant entre les revendications telles que déposées et les revendications telles que modifiées, et ne la remplace pas. Elle doit figurer sur une feuille distincte et doit être munie d'un titre permettant de l'identifier comme telle, constitué de préférence des mots "Déclaration selon l'article 19.1)"

Elle ne doit contenir aucun commentaire dénigrant relatif au rapport de recherche internationale ou à la pertinence des citations que ce dernier contient. Elle ne peut se référer à des citations se rapportant à une revendication donnée et contenues dans le rapport de recherche internationale qu'en relation avec une modification de cette revendication.

Conséquence du fait qu'une demande d'examen préliminaire international ait déjà été présentée

Si, au moment du dépôt de modifications effectuées en vertu de l'article 19, une demande d'examen préliminaire international a déjà été présentée, le déposant doit de préférence, lors du dépôt des modifications auprès du Bureau international, déposer également une copie de ces modifications auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 62.2a), première phrase).

Conséquence au regard de la traduction de la demande internationale lors de l'ouverture de la phase nationale

L'attention du déposant est appelée sur le fait qu'il peut avoir à remettre aux offices désignés ou élus, lors de l'ouverture de la phase nationale, une traduction des revendications telles que modifiées en vertu de l'article 19 au lieu de la traduction des revendications telles que déposées ou en plus de celle-ci.

Pour plus de précisions sur les exigences de chaque office désigné ou élu, voir le volume II du Guide du déposant du PCT.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

(article 18 et règles 43 et 44 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire B 13405 .3MDT	POUR SUITE A DONNER	voir la notification de transmission du rapport de recherche internationale (formulaire PCT/ISA/220) et, le cas échéant, le point 5 ci-après
Demande internationale n° PCT/FR 00/ 00427	Date du dépôt international(jour/mois/année) 21/02/2000	(Date de priorité (la plus ancienne) (jour/mois/année) 22/02/1999
Déposant		
COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE et al.		

Le présent rapport de recherche internationale, établi par l'administration chargée de la recherche internationale, est transmis au déposant conformément à l'article 18. Une copie en est transmise au Bureau international.

Ce rapport de recherche internationale comprend 3 feilles.

Il est aussi accompagné d'une copie de chaque document relatif à l'état de la technique qui y est cité.

1. Base du rapport

- a. En ce qui concerne la **langue**, la recherche internationale a été effectuée sur la base de la demande internationale dans la langue dans laquelle elle a été déposée, sauf indication contraire donnée sous le même point.
 - la recherche internationale a été effectuée sur la base d'une traduction de la demande internationale remise à l'administration.
- b. En ce qui concerne les **séquences de nucléotides ou d'acides aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), la recherche internationale a été effectuée sur la base du listage des séquences :
 - contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.
 - déposée avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.
 - remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.
 - remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.
 - La déclaration, selon laquelle le listage des séquences présenté par écrit et fourni ultérieurement ne vas pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.
 - La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous forme déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences présenté par écrit, a été fournie.

2. Il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (voir le cadre I).

3. Il y a absence d'unité de l'invention (voir le cadre II).

4. En ce qui concerne le titre,

- le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant.
- Le texte a été établi par l'administration et a la teneur suivante:

PROCEDE DE FABRICATION DE MORPHOLINO-NUCLEOTIDES, ET LEUR UTILISATION POUR L'ANALYSE ET LE MARQUAGE DE SEQUENCES D'ACIDS NUCLEIQUES

5. En ce qui concerne l'abrégué,

- le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant
- le texte (reproduit dans le cadre III) a été établi par l'administration conformément à la règle 38.2b). Le déposant peut présenter des observations à l'administration dans un délai d'un mois à compter de la date d'expédition du présent rapport de recherche internationale.

6. La figure des dessins à publier avec l'abrégué est la Figure n°

- suggérée par le déposant.
- parce que le déposant n'a pas suggéré de figure.
- parce que cette figure caractérise mieux l'invention.

Aucune des figures n'est à publier.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De l'Organisation internationale No
PCT/FR 00/00427

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 C12P19/34 C12Q1/68 C07H21/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 7 C12P C12Q C07H

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 95 07907 A (COMMISSARIAT ENERGIE ATOMIQUE ;CENTRE NAT ETD SPATIALES (FR); MOLK) 23 mars 1995 (1995-03-23) *Résumé* *Figs. des pages 4, 14 and 15*. *Revendications 1, 4 and 8.* ---	12-17
X	US 4 515 781 A (TORRENCE PAUL F ET AL) 7 mai 1985 (1985-05-07) colonne 3; figure I colonne 4, ligne 31 -colonne 5, ligne 29 colonne 5, ligne 61 - ligne 66 --- -/-	12-17

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

21 juin 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

28/06/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Mata Vicente, T.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No
PCT/FR 00/00427

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	BROWN ET AL.: "The Reduction of the Adduct of Periodate-oxidised Adenosine-5' Phosphate and Methylamine." J. CHEM. SOC., 1965, pages 5072-5073, XP002121978 page 5072 ----	16
X	GIRAUT ET AL.: "Use of Morpholinonucleosides to Conjugate Oxidised DNA Bases to Proteins." BIOCONJUGATE CHEM., vol. 7, 1996, pages 445-450, XP002121979 page 445; figure 1 page 448; figure 2 ----	16
P,X	MARCIACQ ET AL.: "Synthesis and enzymatic incorporation of Morpholino thymidine-5'-triphosphate in DNA fragments." TETRAHEDRON LETT., vol. 40, 18 juin 1999 (1999-06-18), pages 4673-4676, XP004167188 page 4673 -page 4674; figure 1 ----	1-7, 11-17

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 00/00427

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9507907 A	23-03-1995	FR 2710068 A DE 69415030 D DE 69415030 T EP 0719265 A JP 9506858 T US 5721341 A	24-03-1995 14-01-1999 10-06-1999 03-07-1996 08-07-1997 24-02-1998
US 4515781 A	07-05-1985	JP 1053880 B JP 1575633 C JP 59205394 A	15-11-1989 24-08-1990 20-11-1984

THIS PAGE BLANK (USPTO)

TRAITEMENT COOPERATION EN MATIER

BREVETS

Expéditeur: L'ADMINISTRATION CHARGEÉE DE
LA RECHERCHE INTERNATIONALE

BREVATOME

A l'att. de Des Termes, Monique
3, rue du Docteur Lancereaux
F-75008 Paris
FRANCE



PCT

NOTIFICATION DE TRANSMISSION DU
RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE
OU DE LA DECLARATION

(règle 44.1 du PCT)

Destinataire	Date d'expédition (jour/mois/année)	
BREVATOME A l'att. de Des Termes, Monique 3, rue du Docteur Lancereaux F-75008 Paris FRANCE	28/06/2000	
Référence du dossier du déposant ou du mandataire B 13405.3MDT	POUR SUITE A DONNER voir les paragraphes 1 et 4 ci-après	
Demande internationale n° PCT/FR 00/00427	Date du dépôt international (jour/mois/année)	21/02/2000
Déposant COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE et al.		

<p>1. <input checked="" type="checkbox"/> Il est notifié au déposant que le rapport de recherche internationale a été établi et lui est transmis ci-joint. Dépôt de modifications et d'une déclaration selon l'article 19 : Le déposant peut, s'il le souhaite, modifier les revendications de la demande internationale (voir la règle 46):</p> <p>Quand? Le délai dans lequel les modifications doivent être déposées est de deux mois à compter de la date de transmission du rapport de recherche internationale : pour plus de précisions, voir cependant les notes figurant sur la feuille d'accompagnement.</p> <p>Où? Directement auprès du Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse n° de télécopieur: (41-22)740.14.35</p> <p>Pour des instructions plus détaillées, voir les notes sur la feuille d'accompagnement.</p>	
<p>2. <input type="checkbox"/> Il est notifié au déposant qu'il ne sera pas établi de rapport de recherche internationale et la déclaration à cet effet, prévue à l'article 17.2(a), est transmise ci-joint.</p>	
<p>3. <input type="checkbox"/> En ce qui concerne la réserve pouvant être formulée, conformément à la règle 40.2, à l'égard du paiement d'une ou de plusieurs taxes additionnelles, il est notifié au déposant que</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> la réserve ainsi que la décision y relative ont été transmises au Bureau international en même temps que la requête du déposant tendant à ce que le texte de la réserve et celui de la décision en question soient notifiés aux offices désignés. <input type="checkbox"/> la réserve n'a encore fait l'objet d'aucune décision; dès qu'une décision aura été prise, le déposant en sera avisé. 	
<p>4. Mesure(s) consécutive(s) : Il est rappelé au déposant ce qui suit:</p> <p>Peu après l'expiration d'un délai de 18 mois à compter de la date de priorité, la demande internationale sera publiée par le Bureau international. Si le déposant souhaite éviter ou différer la publication, il doit faire parvenir au Bureau international une déclaration de retrait de la demande internationale, ou de la revendication de priorité, conformément aux règles 90bis.1 et 90bis.3, respectivement, avant l'achèvement de la préparation technique de la publication internationale.</p> <p>Dans un délai de 19 mois à compter de la date de priorité, le déposant doit présenter la demande d'examen préliminaire international s'il souhaite que l'ouverture de la phase nationale soit reportée à 30 mois à compter de la date de priorité (ou même au-delà dans certains offices).</p> <p>Dans un délai de 20 mois à compter de la date de priorité, le déposant doit accomplir les démarches prescrites pour l'ouverture de la phase nationale auprès de tous les offices désignés qui n'ont pas été élus dans la demande d'examen préliminaire international ou dans une élection ultérieure avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité ou qui ne pouvaient pas être élus parce qu'ils ne sont pas liés par le chapitre II.</p>	

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale	Fonctionnaire autorisé
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Andria Overbeeke-Siepkes

THIS PAGE BLANK (USPTO)

NOTES RELATIVES AU FORMULAIRE PCT/ISA/220

Les présentes notes sont destinées à donner les instructions essentielles concernant le dépôt de modifications selon l'article 19. Les notes sont fondées sur les exigences du Traité de coopération en matière de brevets (PCT), du règlement d'exécution et des instructions administratives du PCT. En cas de divergence entre les présentes notes et ces exigences, ce sont ces dernières qui priment. Pour de plus amples renseignements, on peut aussi consulter le Guide du déposant du PCT, qui est une publication de l'OMPI.

Dans les présentes notes, les termes "article", "règle" et "instruction" renvoient aux dispositions du traité, de son règlement d'exécution et des instructions administratives du PCT, respectivement.

INSTRUCTIONS CONCERNANT LES MODIFICATIONS SELON L'ARTICLE 19

Après réception du rapport de recherche internationale, le déposant a la possibilité de modifier une fois les revendications de la demande internationale. On notera cependant que, comme toutes les parties de la demande internationale (revendications, description et dessins) peuvent être modifiées au cours de la procédure d'examen préliminaire international, il n'est généralement pas nécessaire de déposer de modifications des revendications selon l'article 19 sauf, par exemple, au cas où le déposant souhaite que ces dernières soient publiées aux fins d'une protection provisoire ou a une autre raison de modifier les revendications avant la publication internationale. En outre, il convient de rappeler que l'obtention d'une protection provisoire n'est possible que dans certains Etats.

Quelles parties de la demande internationale peuvent être modifiées?

Selon l'article 19, les revendications exclusivement.

Durant la phase internationale, les revendications peuvent aussi être modifiées (ou modifiées à nouveau) selon l'article 34 auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international. La description et les dessins ne peuvent être modifiées que selon l'article 34 auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international.

Lors de l'ouverture de la phase nationale, toutes les parties de la demande internationale peuvent être modifiées selon l'article 28 ou, le cas échéant, selon l'article 41.

Quand?

Dans un délai de deux mois à compter de la date de transmission du rapport de recherche internationale ou de 16 mois à compter de la date de priorité, selon l'échéance la plus tardive. Il convient cependant de noter que les modifications seront réputées avoir été reçues en temps voulu si elles parviennent au Bureau international après l'expiration du délai applicable mais avant l'achèvement de la préparation technique de la publication internationale (règle 46.1).

Où ne pas déposer les modifications?

Les modifications ne peuvent être déposées qu'auprès du Bureau international; elles ne peuvent être déposées ni auprès de l'office récepteur ni auprès de l'administration chargée de la recherche internationale (règle 46.2).

Lorsqu'une demande d'examen préliminaire international a été/est déposée, voir plus loin.

Comment?

Soit en supprimant entièrement une ou plusieurs revendications, soit en ajoutant une ou plusieurs revendications nouvelles ou encore en modifiant le texte d'une ou de plusieurs des revendications telles que déposées.

Une feuille de remplacement doit être remise pour chaque feuille des revendications qui, en raison d'une ou de plusieurs modifications, diffère de la feuille initialement déposée.

Toutes les revendications figurant sur une feuille de remplacement doivent être numérotées en chiffres arabes. Si une revendication est supprimée, il n'est pas obligatoire de renumeroter les autres revendications. Chaque fois que des revendications sont renumerotées, elles doivent l'être de façon continue (instruction 205.b)).

Les modifications doivent être effectuées dans la langue dans laquelle la demande internationale est publiée.

Quels documents doivent/peuvent accompagner les modifications?

Lettre (instruction 205.b)):

Les modifications doivent être accompagnées d'une lettre.

La lettre ne sera pas publiée avec la demande internationale et les revendications modifiées. Elle ne doit pas être confondue avec la "déclaration selon l'article 19.1)" (voir plus loin sous "Déclaration selon l'article 19.1").

La lettre doit être rédigée en anglais ou en français, au choix du déposant. Cependant, si la langue de la demande internationale est l'anglais, la lettre doit être rédigée en anglais; si la langue de la demande internationale est le français, la lettre doit être rédigée en français.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

NOTES RELATIVES AU FORMULAIRE PCT/ISA/220 (suite)

La lettre doit indiquer les différences existant entre les revendications telles que déposées et les revendications telles que modifiées. Elle doit indiquer en particulier, pour chaque revendication figurant dans la demande internationale (étant entendu que des indications identiques concernant plusieurs revendications peuvent être groupées), si

- i) la revendication n'est pas modifiée;
- ii) la revendication est supprimée;
- iii) la revendication est nouvelle;
- iv) la revendication remplace une ou plusieurs revendications telles que déposées;
- v) la revendication est le résultat de la division d'une revendication telle que déposée.

Les exemples suivants illustrent la manière dont les modifications doivent être expliquées dans la lettre d'accompagnement:

1. [Lorsque le nombre des revendications déposées initialement s'élevait à 48 et qu'à la suite d'une modification de certaines revendications il s'élève à 51]:
"Revendications 1 à 15 remplacées par les revendications modifiées portant les mêmes numéros; revendications 30, 33 et 36 pas modifiées; nouvelles revendications 49 à 51 ajoutées."
2. [Lorsque le nombre des revendications déposées initialement s'élevait à 15 et qu'à la suite d'une modification de toutes les revendications il s'élève à 11]:
"Revendications 1 à 15 remplacées par les revendications modifiées 1 à 11."
3. [Lorsque le nombre des revendications déposées initialement s'élevait à 14 et que les modifications consistent à supprimer certaines revendications et à en ajouter de nouvelles]:
"Revendications 1 à 6 et 14 pas modifiées; revendications 7 à 13 supprimées; nouvelles revendications 15, 16 et 17 ajoutées." ou
"Revendications 7 à 13 supprimées; nouvelles revendications 15, 16 et 17 ajoutées; toutes les autres revendications pas modifiées."
4. [Lorsque plusieurs sortes de modifications sont faites]:
"Revendications 1-10 pas modifiées; revendications 11 à 13, 18 et 19 supprimées; revendications 14, 15 et 16 remplacées par la revendication modifiée 14; revendication 17 divisée en revendications modifiées 15, 16 et 17; nouvelles revendications 20 et 21 ajoutées."

"Déclaration selon l'article 19.1)" (Règle 46.4)

Les modifications peuvent être accompagnées d'une déclaration expliquant les modifications et précisant l'incidence que ces dernières peuvent avoir sur la description et sur les dessins (qui ne peuvent pas être modifiés selon l'article 19.1)).

La déclaration sera publiée avec la demande internationale et les revendications modifiées.

Elle doit être rédigée dans la langue dans laquelle la demande internationale est publiée.

Elle doit être succincte (ne pas dépasser 500 mots si elle est établie ou traduite en anglais).

Elle ne doit pas être confondue avec la lettre expliquant les différences existant entre les revendications telles que déposées et les revendications telles que modifiées, et ne la remplace pas. Elle doit figurer sur une feuille distincte et doit être munie d'un titre permettant de l'identifier comme telle, constitué de préférence des mots "Déclaration selon l'article 19.1)"

Elle ne doit contenir aucun commentaire dénigrant relatif au rapport de recherche internationale ou à la pertinence des citations que ce dernier contient. Elle ne peut se référer à des citations se rapportant à une revendication donnée et contenues dans le rapport de recherche internationale qu'en relation avec une modification de cette revendication.

Conséquence du fait qu'une demande d'examen préliminaire international ait déjà été présentée

Si, au moment du dépôt de modifications effectuées en vertu de l'article 19, une demande d'examen préliminaire international a déjà été présentée, le déposant doit de préférence, lors du dépôt des modifications auprès du Bureau international, déposer également une copie de ces modifications auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 62.2a), première phrase).

Conséquence au regard de la traduction de la demande internationale lors de l'ouverture de la phase nationale

L'attention du déposant est appelée sur le fait qu'il peut avoir à remettre aux offices désignés ou élus, lors de l'ouverture de la phase nationale, une traduction des revendications telles que modifiées en vertu de l'article 19 au lieu de la traduction des revendications telles que déposées ou en plus de celle-ci.

Pour plus de précisions sur les exigences de chaque office désigné ou élu, voir le volume II du Guide du déposant du PCT.

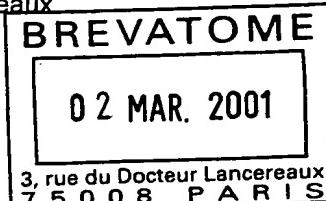
THIS PAGE BLANK (USPTO)

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

Expéditeur: L'ADMINISTRATION CHARGEÉE DE
L'EXAMEN PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL

Destinataire:

Des Termes, Monique
BREVATOME
3, rue du Docteur Lancereaux
F-75008 Paris
FRANCE



PCT

NOTIFICATION DE TRANSMISSION DU RAPPORT D'EXAMEN PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL (règle 71.1 du PCT)

Date d'expédition
(jour/mois/année) 28.02.2001

Référence du dossier du déposant ou du mandataire
B 13405.3MDT

NOTIFICATION IMPORTANTE

Demande internationale No.
PCT/FR00/00427

Date du dépôt international (jour/mois/année)
21/02/2000

Date de priorité (jour/mois/année)
22/02/1999

Déposant
COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE et al.

- Il est notifié au déposant que l'administration chargée de l'examen préliminaire international a établi le rapport d'examen préliminaire international pour la demande internationale et le lui transmet ci-joint, accompagné, le cas échéant, de ces annexes.
- Une copie du présent rapport et, le cas échéant, de ses annexes est transmise au Bureau international pour communication à tous les offices élus.
- Si tel ou tel office élu l'exige, le Bureau international établira une traduction en langue anglaise du rapport (à l'exclusion des annexes de celui-ci) et la transmettra aux offices intéressés.

4. RAPPEL

Pour aborder la phase nationale auprès de chaque office élu, le déposant doit accomplir certains actes (dépôt de traduction et paiement des taxes nationales) dans le délai de 30 mois à compter de la date de priorité (ou plus tard pour ce qui concerne certains offices) (article 39.1) (voir aussi le rappel envoyé par le Bureau international dans le formulaire PCT/IB/301).

Lorsqu'une traduction de la demande internationale doit être remise à un office élu, elle doit comporter la traduction de toute annexe du rapport d'examen préliminaire international. Il appartient au déposant d'établir la traduction en question et de la remettre directement à chaque office élu intéressé.

Pour plus de précisions en ce qui concerne les délais applicables et les exigences des offices élus, voir le Volume II du Guide du déposant du PCT.

Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international



Office européen des brevets
D-80298 Munich
Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d
Fax: +49 89 2399 - 4465

Fonctionnaire autorisé

Gallego, A

Tél. +49 89 2399-8102



THIS PAGE BLANK (USPTO)

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(article 36 et règle 70 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire B 13405.3MDT	POUR SUITE A DONNER	voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)
Demande internationale n° PCT/FR00/00427	Date du dépôt international (<i>jour/mois/année</i>) 21/02/2000	Date de priorité (<i>jour/mois/année</i>) 22/02/1999

Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB
C12P19/34

Déposant

COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE et al.

1. Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.
2. Ce RAPPORT comprend 4 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.
 - Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).

Ces annexes comprennent une feuilles.

3. Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:

- I Base du rapport
- II Priorité
- III Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
- IV Absence d'unité de l'invention
- V Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration
- VI Certains documents cités
- VII Irrégularités dans la demande internationale
- VIII Observations relatives à la demande internationale

Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 10/08/2000	Date d'achèvement du présent rapport 28.02.2001
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international: Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Fonctionnaire autorisé Gohlke, P N° de téléphone +49 89 2399 8549



THIS PAGE BLANK (USPTO)

RAPPORT D'EXAMEN PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL

Demande internationale n° PCT/FR00/00427

I. Bas du rapport

1. Ce rapport a été rédigé sur la base des éléments ci-après (*les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées dans le présent rapport comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications (règles 70.16 et 70.17).*) :

Description, pages:

1-54 version initiale

Revendications, N°:

1,2 (partie),3 (partie), version initiale
4-17

2 (partie), reçue(s) le 30/01/2001 avec la lettre du 24/01/2001
3 (partie)

Dessins, feuilles:

1/3-3/3 version initiale

2. En ce qui concerne la **langue**, tous les éléments indiqués ci-dessus étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue dans laquelle la demande internationale a été déposée, sauf indication contraire donnée sous ce point.

Ces éléments étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue suivante: , qui est :

- la langue d'une traduction remise aux fins de la recherche internationale (selon la règle 23.1(b)).
 - la langue de publication de la demande internationale (selon la règle 48.3(b)).
 - la langue de la traduction remise aux fins de l'examen préliminaire internationale (selon la règle 55.2 ou 55.3).

3. En ce qui concerne les séquences de nucléotides ou d'acide aminés divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), l'examen préliminaire internationale a été effectué sur la base du listage des séquences :

- contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.
 - déposé avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.
 - remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.
 - remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.
 - La déclaration, selon laquelle le listage des séquences par écrit et fourni ultérieurement ne va pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**RAPPORT D'EXAMEN
PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR00/00427

- La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listages des séquences Présenté par écrit, a été fournie.

4. Les modifications ont entraîné l'annulation :

- de la description, pages :
 des revendications, n°s :
 des dessins, feuilles :

5. Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

(Toute feuille de remplacement comportant des modifications de cette nature doit être indiquée au point 1 et annexée au présent rapport)

6. Observations complémentaires, le cas échéant :

V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Déclaration

Nouveauté	Oui : Revendications 1-17 Non : Revendications
Activité inventive	Oui : Revendications 1-17 Non : Revendications
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications 1-17 Non : Revendications

2. Citations et explications
voir feuille séparée

VII. Irrégularités dans la demande internationale

Les irrégularités suivantes, concernant la forme ou le contenu de la demande internationale, ont été constatées :
voir feuille séparée

THIS PAGE BLANK (USPTO)

S ction V:

La présente demande concerne des dérivés de nucléosides triphosphates dans lesquels la partie osidique est substituée convenablement par une morpholine. Ces dérivés morpholino-nucléotides modifiés sont faciles à synthétiser et sont reconnus par les enzymes polymérase ou transcriptase inverse et peuvent ainsi être incorporés par voie enzymatique à l'extrémité 3'OH d'un acide nucléique, comme terminateurs de chaînes dans un procédé de séquençage d'ADN ou d'ARN par la méthode de Sanger, ou encore pour le marquage de fragments d'ADN ou d'ARN sans en modifier les bases nucléiques.

Certains de ces dérivés morpholino-nucléotides sont connus, mais aucun des documents de l'art antérieur ne concerne leur utilisation comme terminateurs de chaînes ou comme marqueurs (voir pages 11 et 12 de la présente demande).

D'autre part aucun des documents cités dans le rapport de recherche international ne décrit les dérivés morpholino-nucléotides triphosphates selon les revendications 12 à 15. WO 95/07907 (= D1) décrit des dérivés morpholino-nucléosides dans lesquels l'hydroxyle en position 5' peut incorporer un groupement mono-, di- ou tri-phosphate sans toutefois les exemplifiés. Ces dérivés comportant un cycle morpholine substitué sont utilisés pour la préparation d'anticorps dirigés contre un haptène fixé au cycle morpholine (voir également l'article de Girault et al.: 'Use of Morphilinonucleosides to Conjugate Oxidised DNA Bases to Proteins.' Bioconjugate Chem., vol. 7, 1996, pages 445-450).

Le document de Brown et al.: 'The Reduction of the Adduct of Periodate-oxidised Adenosine-5' Phosphate and Methylamine.' J. Chem. Soc., 1965, pages 5072-5073 (= D2), décrit la réduction d'un dérivé morpholino-nucléoside **monophosphate**.

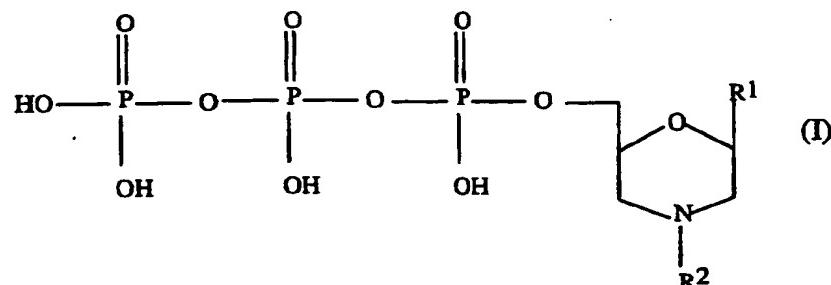
Le brevet US-A-4 515 781 (= D3) concerne des oligonucléotides ayant un groupe morpholinoadenylate en chaîne terminale permettant d'augmenter la résistance aux nucléases et d'augmenter l'activité biologique de l'oligonucléotide parent.

Ainsi l'objet des **revendications 1 à 17** semble remplir les conditions des articles 33(2) et (3) du PCT.

Section VII:

Contrairement à ce qu'exige la règle 5.1 a) ii) PCT, la description n'indique pas l'état de la technique antérieure pertinent exposé dans D1-D3 et ne cite pas ces documents.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

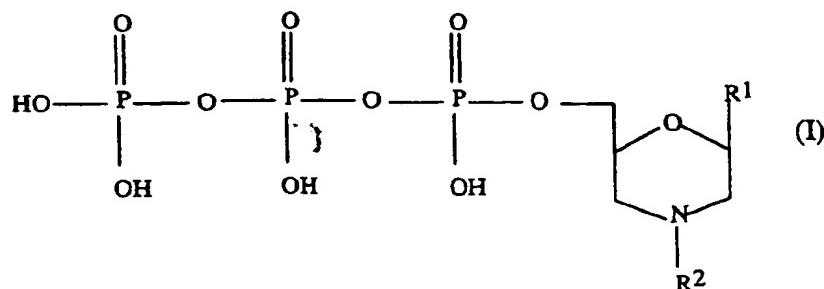


dans laquelle R¹ représente une base nucléique et R² représente un groupe répondant à l'une des formules suivantes :

- 5 - (CH₂)_n-NH-R³
 - (CH₂)_n-CO-R³
 - (CH₂)_n-SR³
 - (CH₂)_n-OR³

10 dans lesquelles n est un nombre entier allant de 1 à 12
 et R³ représente un composé choisi parmi les photoréticulants, les acides gras, les peptides hydrophobes, les anticorps, les enzymes et les fluorophores.

15 3. Procédé de séquençage d'un acide nucléique (ADN ou ARN) par la technique de polymérisation enzymatique de la séquence complémentaire de cet acide nucléique en utilisant des terminateurs de chaînes, dans lequel au moins l'un des 20 terminateurs de chaînes a pour précurseur un composé répondant à la formule :



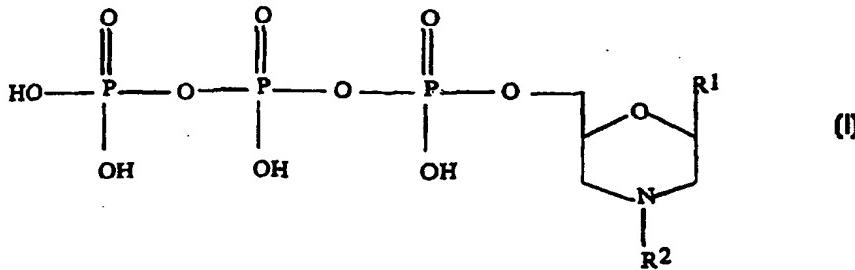
THIS PAGE BLANK (USPTO)

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁷ : C12P 19/34, C12Q 1/68, C07H 21/00	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 00/50626 (43) Date de publication internationale: 31 août 2000 (31.08.00)	
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR00/00427 (22) Date de dépôt international: 21 février 2000 (21.02.00)	(81) Etats désignés: CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).		
(30) Données relatives à la priorité: 99/02170 22 février 1999 (22.02.99) FR 99/12001 27 septembre 1999 (27.09.99) FR	Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues.</i>		
(71) Déposants (<i>pour tous les Etats désignés sauf US</i>): COMMIS-SARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE [FR/FR]; 31-33, rue de la Fédération, F-75752 Paris 15ème (FR). CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE [FR/FR]; 3, rue Michel Ange, F-75794 Paris Cedex 16 (FR).			
(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (<i>US seulement</i>): MARCIACQ, Florence [FR/FR]; 6, rue Gambetta, F-13580 La Fare Les Oliviers (FR). SAUVAIGO, Sylvie [FR/FR]; Le Noyaret, F-38320 Herbeys (FR). MOURET, Jean-François [FR/FR]; Montée du Pilet, F-38500 Coublevie (FR). ISSARTEL, Jean-Paul [FR/FR]; 9, rue du Fournet, F-38120 Saint-Egrève (FR). MOLKO, Didier [FR/FR]; Les Noyers A1.1, 11, avenue de la Gare, F-38210 Tullins (FR).			
(74) Mandataire: DES TERMES, Monique; Brevatome, 3, rue du Docteur Lancereaux, F-75008 Paris (FR).			

(54) Title: METHODS FOR MAKING MORPHOLINO-NUCLEOTIDES, AND THEIR USE FOR ANALYSING AND MARKING NUCLEIC ACID SEQUENCES

(54) Titre: PROCEDE DE FABRICATION DE MORPHOLINO-NUCLEOTIDES, ET LEUR UTILISATION POUR L'ANALYSE ET LE MARQUAGE DE SEQUENCES D'ACIDES NUCLEIQUES



(57) Abstract

The invention concerns the use of morpholino-nucleosides of formula (I) wherein: R¹ represents a nucleic base and R² represents a group corresponding to the following formulae: -(CH₂)_n-NH₂, -(CH₂)_n-SH, -(CH₂)_n-COOH, -(CH₂)_n-OH, -(CH₂)_n-NH-R³, (CH₂)_n-SR³-(CH₂)_n-CO-R³, -(CH₂)_n-OR³ wherein: n is an integer ranging from 1 to 12 and R³ is a group derived from a marker, a protein, an enzyme, a fatty acid or a peptide, as chain terminators in a DNA or RNA sequencing process by Sanger method, or for marking DNA or RNA fragments.

(57) Abrégé

L'invention concerne l'utilisation de morpholino-nucléosides de formule (I): dans laquelle R¹ représente une base nucléique et R² représente un groupe répondant à l'une des formules suivantes: -(CH₂)_n-NH₂, -(CH₂)_n-SH, -(CH₂)_n-COOH, -(CH₂)_n-OH, -(CH₂)_n-NH-R³, -(CH₂)_n-SR³, -(CH₂)_n-CO-R³, -(CH₂)_n-OR³ dans lesquelles n est un nombre entier allant de 1 à 12 et R³ est un groupe dérivé d'un marqueur, d'une protéine, d'une enzyme, d'un acide gras ou d'un peptide, comme terminateurs de chaînes dans un procédé de séquençage d'ADN ou d'ARN par la méthode de Sanger, ou pour le marquage de fragments d'ADN ou d'ARN.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publient des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		

PROCEDE DE FABRICATION DE MORPHOLINO-NUCLEOTIDES, ET LEUR UTILISATION POUR L'ANALYSE ET LE MARQUAGE DE SEQUENCES D'ACIDS NUCLEIQUES

DESCRIPTION

5 Domaine technique

La présente invention a pour objet la fabrication de fragments d'acides nucléiques (ADN ou ARN) allongés enzymatiquement au moyen de morpholino-nucléosides triphosphates. Cette élongation peut être 10 utilisée pour l'analyse de séquences d'acides nucléiques par incorporation de ces dérivés dans des chaînes d'acides nucléiques ainsi que le marquage enzymatique et l'immobilisation ou la détection de séquences.

Ces morpholino-nucléosides triphosphates 15 peuvent encore être utilisés avec une molécule supplémentaire pouvant jouer divers rôles dans de nombreuses applications.

Etat de la technique antérieure

La méthode la plus répandue pour analyser les 20 séquences des acides nucléiques est la technique enzymatique dite de terminaison de chaîne, développée par Sanger et al dans Proceedings of National Academy of Science, 74, 1977, p. 5463-5467 [1]. Elle repose sur les propriétés qu'ont les ADN polymérases-ADN dépendantes de 25 créer des polymères d'ADN complémentaires de la séquence d'un brin d'ADN servant de matrice, à partir d'un mélange de monomères de nucléosides triphosphates naturels. Le

procédé consiste, à partir du brin d'ADN à analyser, à faire une série d'exemplaires du brin complémentaire en ajoutant au milieu réactionnel classique des molécules appelées « terminateurs de chaînes », puis à analyser la longueur des brins néoformés pour déterminer la séquence des bases de la matrice. Le principe de la méthode est expliqué dans le tableau 1 qui suit.

Tableau 1

Séquence à analyser (matrice de la polymérase)

3' HO-ApTpGpCpApApTpCpCpGpApTpGpApCpTpGpApGpCpCpApTpCpG 5'

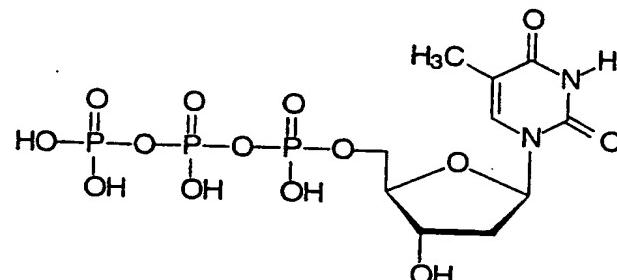
Amorce

5' TpApCpGpTpTpApGpGpC-OH 3'

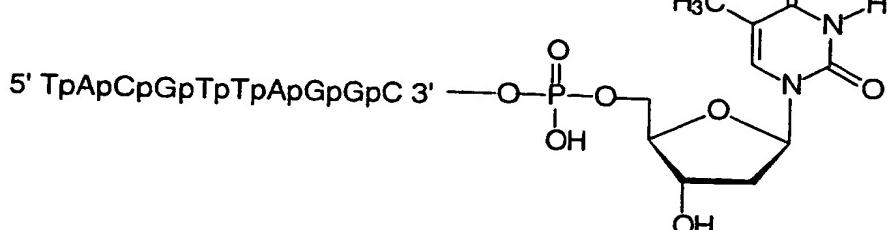


3' HO-ApTpGpCpApApTpCpCpGpApTpGpApCpTpGpApGpCpCpApTpCpG 5'
 5' TpApCpGpTpTpApGpGpC-OH 3'

ADN polymérase



5' Thymidine triphosphate

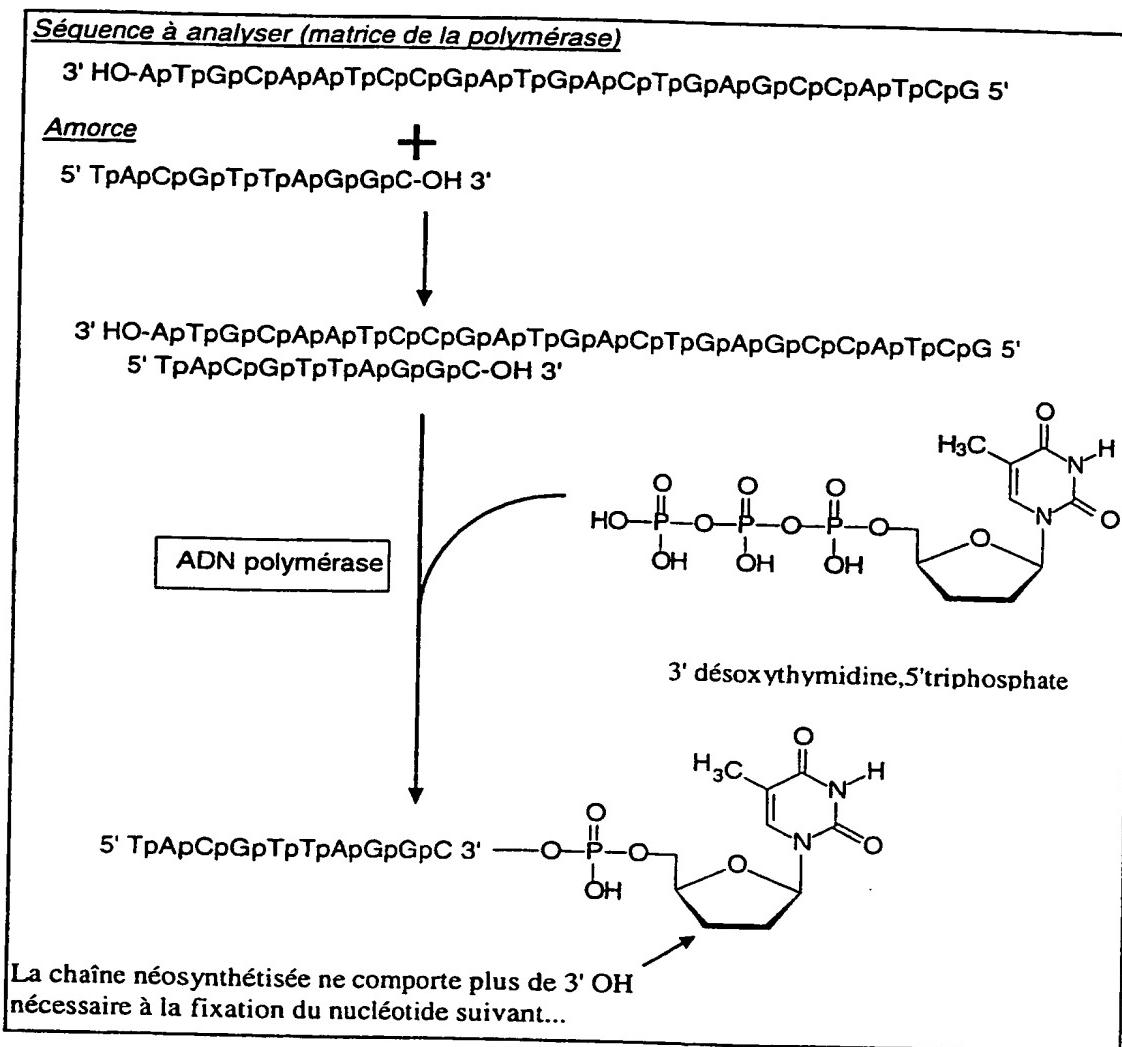


Ce tableau 1 illustre ce qui se produit lorsque l'on met en présence l'ADN polymérase, une amorce constituée par un oligonucléotide de taille réduite, généralement inférieure à 25 bases, et le mélange des quatre nucléosides triphosphates naturels avec le brin d'ADN dont on veut déterminer la séquence, qui constitue la matrice. L'amorce correspond au début de la séquence complémentaire du brin d'ADN à analyser. A partir de cette amorce, qui spontanément entre en interaction avec la séquence complémentaire du brin d'ADN à analyser (hybridation), l'enzyme incorpore des nucléotides complémentaires de la matrice pour construire par elongation-polymérisation un nouveau brin d'ADN, copie complémentaire de cette dernière. Les nouveaux nucléotides sont incorporés exclusivement à partir de l'extrémité 3'-OH terminale de la chaîne en croissance, de manière séquentielle et en respectant les règles de complémentarité entre bases de Watson & Crick. Une thymine est incorporée dans le brin néoformé par complémentarité avec une adénine présente dans le brin servant la matrice, une guanine est incorporée en complémentarité d'une cytosine et réciproquement. Si tous les composés nécessaires sont fournis en quantité non-limitante, l'enzyme catalyse la polymérisation du brin formé jusqu'à ce que ce dernier représente la totalité du brin complémentaire parfait de la matrice.

Par contre, si l'on rajoute au milieu réactionnel une molécule qui est reconnue par la polymérase mais qui ne présente pas d'extrémité 3'-OH terminale libre, chaque fois que cette molécule sera incorporée, le travail de polymérisation de l'enzyme sera interrompu parce que la chaîne ne pourra plus croître à cause de l'absence de site disponible pour ancrer un

nouveau nucléotide (création de brins néoformés interrompus). C'est ce qui est illustré dans le tableau 2 qui suit avec la 3'désoxythymidine, 5'-triphosphate.

Tableau 2



En utilisant ce dérivé de thymidine que l'on appellera « terminateur de chaîne T » à une concentration adéquate, on obtient pour une matrice donnée, une série de brins d'ADN dont la taille est fixée statistiquement par la position des adénines de la matrice. Le résultat

obtenu est illustré dans le tableau 3. La séquence de la matrice est écrite dans la première ligne, la séquence des brins néoformés créés avec le terminateur de chaîne T (noté S) est écrite dans les lignes suivantes.

5

Tableau 3

MATRICE

3'- A T G C A T T C C G A C C T C T G A T C A G -5'

COPIES DE LA MATRICE

5'- S

5'- T A C G S

5'- T A C G T A A G G C S

5'- T A C G T A A G G G C T G G A G A C S

5'- T A C G T A A G G G C T G G A G A C T A G S

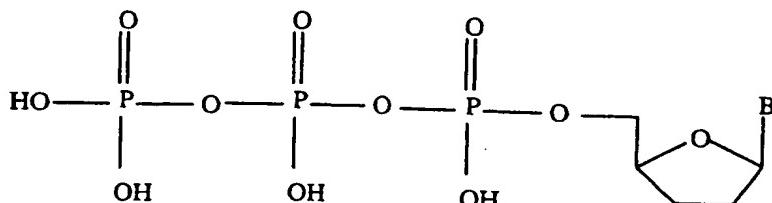
Dans cet exemple, la matrice comporte 5 adénines dans la zone qui est détaillée, l'ADN polymérase pourra donc produire 5 brins néoformés interrompus, de longueurs différentes.

Il suffit ensuite d'analyser ce mélange par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en milieu dénaturant pour déterminer la longueur de chacun des brins obtenus en utilisant le terminateur de chaîne T. La taille des brins néoformés interrompus permet de déduire la position des adénines sur la matrice.

En recommençant trois fois cette expérience avec respectivement des produits terminateurs de chaînes A, G et C, on obtient au total quatre séries de fragments d'ADN dont la longueur permet de déterminer la séquence entière du brin matrice.

La technologie du séquençage des ARN repose sur les mêmes principes, la différence étant que l'enzyme employée est une transcriptase inverse (ou ADN polymérase-ARN dépendante).

Les produits les plus utilisés comme terminateurs de chaîne pour arrêter l'action des ADN polymérases sont des 2',3'-didésoxynucléosides triphosphates de formule :



5

dans laquelle B représente l'une des bases nucléiques A, C, G ou T, comme il est décrit dans le document [1].

La structure de ces produits comparée à celle
10 des nucléosides triphosphates naturels montre l'absence
de la fonction hydroxyle en position 3' qui sert de
position d'attache du nucléotide suivant.

La synthèse chimique des 2',3'-didésoxy-
nucléotides est réalisée selon un protocole long et
15 fastidieux comportant trois grandes étapes. Dans le cas
de la guanine, la première étape de ce processus est la
protection de la fonction amine exocyclique de la guanine
et de la fonction hydroxyle primaire en 5' du sucre. On
réalise ensuite la suppression de la fonction hydroxyle
20 en 3', par élimination puis par réduction de la double
liaison 2'-3' générée. La dernière étape est la
préparation du dérivé triphosphate.

D'autres terminateurs de chaîne ont été
décris dans le document WO-A-96/23807 [2]. Ce sont les
25 5'-triphosphates des arabinonucléosides, des 3'-fluoro-
2',3'-didésoxynucléosides, les 3'-azido-2',3'-
didésoxynucléosides ou les 3'-amino-2',3'-didésoxy-
nucléosides. Leur synthèse est tout aussi laborieuse.

A l'origine de la méthode de Sanger, la visualisation des fragments d'ADN synthétisés se faisait par marquage radioactif au ^{32}P en 5' de l'amorce utilisée pour initier la polymérisation du brin complémentaire.

- 5 Une modification a été apportée en utilisant des amorces porteuses d'un fluorophore. Cette amélioration porte uniquement sur la facilité d'emploi, puisqu'elle supprime l'utilisation de matières radioactives, mais il faut toujours réaliser quatre réactions de séquençage, chacune 10 utilisant un terminateur de polymérisation différent (terminateur A, G, T ou C).

Un nouveau pas a été franchi avec l'emploi de terminateurs de séquences porteurs de fluorophores sur leur base nucléique, comme il est décrit par Prober et 15 al, dans *Science*, 238, 1987, pages 336-341 [3].

Dans ces conditions, le marquage des brins néo-synthétisés n'est plus fait avant la réaction de séquençage, mais directement au moment de l'incorporation du terminateur de séquence. En prenant soin de choisir un 20 fluorophore présentant des propriétés optiques différentes pour chaque base de l'ADN, le protocole expérimental a été très fortement simplifié. On ne pratique plus qu'une seule réaction avec les quatre terminateurs en mélange. De ce fait, à partir d'un unique 25 canal d'électrophorèse, on distingue les quatre nucléotides de la séquence grâce aux longueurs d'ondes d'émission différentes des quatre terminateurs.

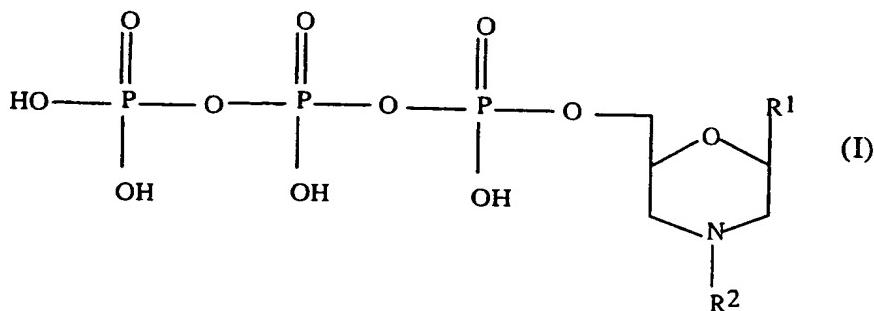
Cette simplification dans le protocole 30 d'analyse n'a pas que des avantages. En effet, les fluorophores sont greffés directement sur la base. Cette modification structurale, localisée au voisinage direct des sites de liaisons hydrogène régissant la reconnaissance entre les bases, entraîne une diminution

de la reconnaissance par les enzymes. Pour compenser cela, une augmentation de la concentration des terminateurs est préconisée, qui conduit à une très grande consommation de la matière première ayant une très forte valeur ajoutée. De plus, la synthèse de ces molécules est toujours aussi délicate.

Exposé de l'invention

La présente invention a notamment pour objet l'utilisation, dans un procédé de séquençage de ce type, de terminateurs de chaînes constitués par des analogues de nucléosides triphosphates plus facile à synthétiser, qui permettent de plus de réaliser un marquage efficace sans modifier les bases nucléiques.

Aussi, l'invention a pour objet un procédé de séquençage d'un acide nucléique (ADN ou ARN) par la technique de polymérisation enzymatique de la séquence complémentaire de cet acide nucléique en utilisant des terminateurs de chaînes, dans lequel au moins l'un des terminateurs de chaînes a pour précurseur un composé répondant à la formule :



dans laquelle R¹ représente une base nucléique et R² représente un groupe répondant à l'une des formules

suitantes :

- | | |
|---|--|
| - $(CH_2)_n-NH_2$
- $(CH_2)_n-COOH$
- $(CH_2)_n-NH-R^3$
5 - $(CH_2)_n-CO-R^3$ | - $(CH_2)_n-SH$
- $(CH_2)_n-OH$
- $(CH_2)_n-SR^3$
- $(CH_2)_n-OR^3$ |
|---|--|

dans lesquelles n est un nombre entier allant de 1 à 12 et R^3 est un groupe dérivé d'un marqueur, d'une protéine, d'une enzyme, d'un acide gras ou d'un peptide.

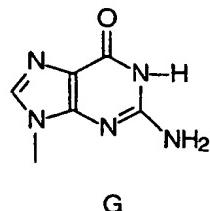
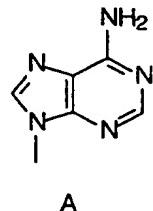
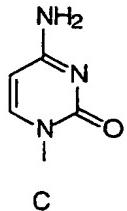
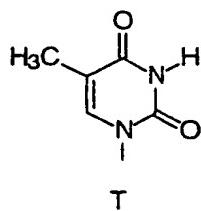
10 Les terminateurs de chaînes utilisés dans ce procédé sont des dérivés de nucléotides comportant une base nucléique R^1 qui permet la reconnaissance par les polymérases et les transcriptases, et le respect des règles de complémentarités de Watson et Crick.

15 Les bases nucléiques utilisées pour R^1 peuvent être naturelles ou synthétiques. Les bases naturelles sont généralement choisies parmi l'adénine, la guanine, la cytosine, la thymine, l'uracile, la xanthine, l'hypoxanthine, la 2-aminopurine et leurs dérivés.

20 Les bases synthétiques sont des analogues ou des dérivés des bases nucléiques naturelles, qui sont capables d'interagir avec les bases naturelles.

De préférence, R^1 répond à l'une des formules suivantes :

25



Dans les dérivés nucléotides de formule (I), la partie osidique est remplacée par une morpholine convenablement substituée comportant :

5 1°) Une fonction hydroxyméthyle voisine de l'oxygène cyclique, estérifiée par un groupement acide triphosphorique. Cette partie de la molécule mime la partie 4', 5' des nucléotides et permet la fixation par la polymérase ou la transcriptase à la chaîne d'ADN ou d'ARN en croissance.

10 2°) Une fonction amine substituée par R₂, qui peut éventuellement permettre le greffage d'un chromophore ou d'un groupe biologiquement actif et surtout, qui interdit l'attachement d'un autre nucléotide (interruption de la polymérisation).

15 Par rapport aux dérivés classiquement utilisés dans la méthode de Sanger tels que ceux décrits dans les document [1], [2] et [3], ces composés peuvent être synthétisés en une seule étape directement à partir des ribonucléosides triphosphates, comme on le verra ci-après.

20 L'intérêt de ces composés réside dans le très grand choix de groupes R² (substituants du cycle morpholine) utilisables qui permettent de fonctionnaliser ce cycle. Des fonctions telles que des acides, amines, thiols ou éthers peuvent être ajoutées et permettront le greffage de composés chimiques variés, notamment de marqueurs utiles pour l'identification des fragments d'ADN ou d'ARN.

25 Les marqueurs utilisés pour R³ peuvent être choisis dans un ensemble très vaste de molécules connues pour le marquage de nucléotides. Ils peuvent être choisis par exemple parmi les produits radioactifs, les produits luminescents, électroluminescents et fluorescents, les

molécules capables de se coupler à d'autres molécules, les molécules autorisant des interactions de type antigène-anticorps, et les marqueurs enzymatiques.

De préférence, pour le séquençage des acides nucléiques, R³ est un fluorophore, par exemple, choisi parmi tous les dérivés de la fluorescéine ou de la rhodamine. On peut aussi utiliser ceux de la biotine. En particulier, seront choisis ceux des dérivés utilisés pour le marquage des acides nucléiques.

Des dérivés de nucléosides dans lesquels la partie osidique du nucléoside a été remplacée par une morpholine, ont déjà été synthétisés dans l'art antérieur, comme il apparaît dans les documents suivants :

- 15 - Hileman et al, Bioconjugate Chemistry, 5, 1994, pages 436-444 [4],
- Broker et al, Nucleic Acids Research, 5, 1978, pages 363-385 [5],
- Agrawal et al, Nucleic Acids Research, 14, 1986, pages 6227-6245 [6],
- 20 - FR-A- 2 710 068 [7], et
- Rayford et al, Journal of Biological Chemistry, 260, 1985, pages 15708-15713, [8].

Les dérivés de nucléosides du document [4] comportent un cycle morpholino qui est substitué par une fluorescéine ou une rhodamine. Ils sont utilisés pour l'étude de protéines et non comme terminateurs de chaîne dans un procédé de séquençage d'acides nucléiques.

Leur fabrication diffère du processus que nous rapportons, car le fluorophore est incorporé directement sur le cycle morpholine. La technique que nous décrivons fait appel à une étape de purification intermédiaire qui

nous a permis d'isoler et de parfaitement caractériser le produit final, au contraire de Hileman et al.

Dans le document [5], il s'agit d'ARN de transfert modifié à son extrémité 3' par un dérivé de nucléoside comportant un cycle morpholine substitué par une biotine. Ce produit est utilisé comme marqueur chimique des ARN de transfert pour étudier la localisation chromosomique des gènes des ARN de transfert.

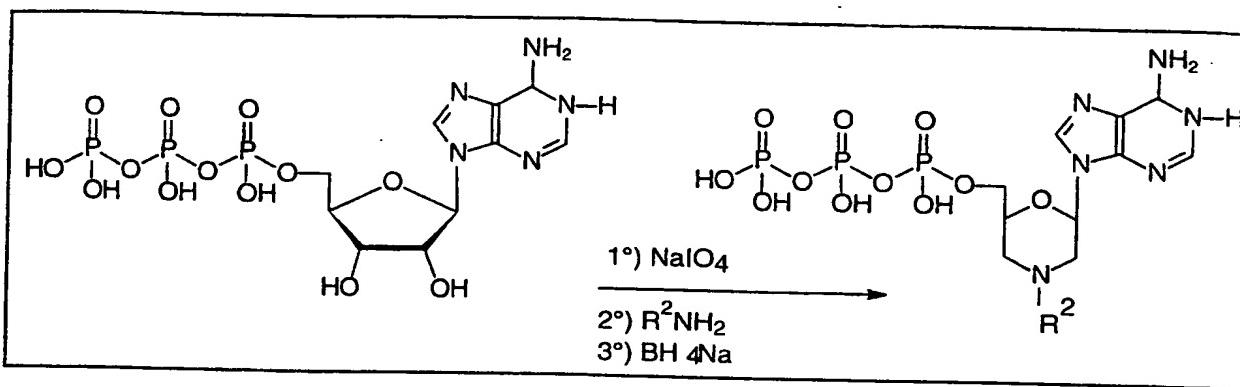
Dans le document [6], il s'agit d'un oligonucléotide comportant un cycle morpholine couplé à une biotine, qui est utilisé comme sonde pour la détection et l'isolement de gènes spécifiques.

Le document [7] décrit des dérivés de nucléosides comportant un cycle morpholine substitué. Ils sont utilisés pour la préparation d'anticorps dirigés contre un haptène fixé au cycle morpholine du dérivé de nucléoside.

Le document [8] illustre une morpholinoаденосине substituée par CH_2COOH , utilisée pour la chromatographie d'affinité.

Ainsi, aucun de ces documents ne concerne l'utilisation de dérivés de nucléotides tels que ceux de l'invention, comme terminateurs de chaînes, dans un procédé de séquençage d'acides nucléiques selon la méthode de Sanger.

Les dérivés de nucléotides utilisés dans le procédé de l'invention, peuvent être préparés en une seule étape, directement à partir des ribonucléosides triphosphates selon le schéma réactionnel suivant illustré avec R¹ représentant l'adénine.

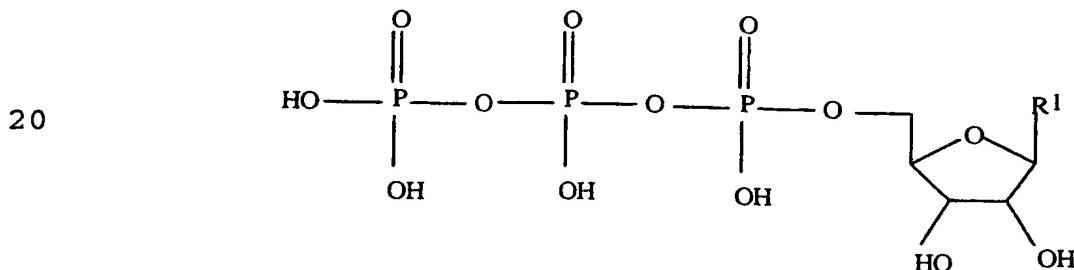


Ce procédé est du même type que les procédés décrits dans les documents [6] et [7] pour former le cycle morpholino.

On peut aussi préparer les dérivés de nucléotides de formule (I) à partir des morpholino-nucléosides et introduire ensuite le groupe triphosphate en utilisant le protocole d'Eckstein, comme il est décrit par Ludwig et al dans J. Org. Chem. 54, 1989, pages 631-635 [9].

Les enzymes utilisables pour la polymérisation enzymatique peuvent être ceux décrits ci-dessous.

Selon l'invention, le procédé de préparation de morpholino-nucléotides de formule (I) comprend la réaction d'un nucléoside triphosphate de formule :



dans laquelle R¹ a la signification donnée ci-dessus, avec
25 un periodate, un composé de formule R² NH₂ dans laquelle R² a la signification donnée ci-dessus et du borohydrure de sodium.

L'invention concerne également l'utilisation d'un dérivé de nucléotide ayant pour précurseur un composé de formule (I) pour le marquage en 3' de fragments d'acide nucléique (ADN ou ARN) par incorporation enzymatique du dérivé de nucléotide à l'extrémité 3'OH du fragment d'acide nucléique.

Elle concerne aussi le procédé de fabrication d'un fragment d'acide nucléique (ADN ou ARN) marqué 3' par incorporation enzymatique du dérivé de nucléotide mentionné ci-dessus à l'extrémité 3'OH du fragment d'acide nucléique.

L'enzyme utilisée peut être le fragment de Klenow de l'ADN polymérase, et on utilise alors une matrice ou template pour fixer le morpholino-nucléoside sur le fragment d'acide nucléique qui sert d'amorce.

L'enzyme utilisée peut aussi être une polymérase thermorésistante d'une bactérie thermophile ou la terminal transférase ou la transcriptase inverse.

Les fragments d'ADN ou d'ARN ainsi marqués sont utilisables pour bloquer toute ligation ultérieure et assurer une protection contre les exonucléases, ainsi que pour détecter des fragments d'ADN ou d'ARN.

On peut encore utiliser un morpholino-nucléotide modifié ayant pour précurseur un composé de formule (I) pour modifier un fragment d'acide nucléique (ADN ou ARN) par incorporation enzymatique à l'extrémité 3' de celui-ci d'un morpholino-nucléotide modifié ayant pour précurseur un composé de formule (I) comprenant en R³ un composé choisi parmi les photoréticulants par exemple pour réticulation sur ADN ou sur un support quelconque ; les acides gras, les peptides hydrophobes, les anticorps, par exemple pour faciliter la pénétration dans les cellules, les enzymes ou parties d'enzymes telles que les

phosphatases alcalines, les peroxydases, les acétylcholinestérases pour la détection, les enzymes de restriction pour le clivage de l'ADN vicinal, et les fluorophores.

5 Comme précédemment l'incorporation de ce morpholino-nucléotide modifié est effectuée par voie enzymatique. Les bases azotées, les marqueurs et les enzymes utilisables peuvent être les mêmes que ceux précités.

10 Selon l'invention, le dérivé de nucléotide, le morpholino-nucléotide modifié et le terminateur de chaîne utilisés respectivement pour le marquage en 3' de fragments d'acide nucléique, pour la modification de fragments d'acide nucléique ou pour le séquençage d'un
15 acide nucléique, peuvent être le composé (I) sous forme de monophosphate.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront mieux à la lecture de la description qui suit d'exemples de réalisation, donnés
20 bien entendu à titre illustratif et non limitatif, en référence au dessin annexé.

Brève description des figures

La figure 1 est un diagramme illustrant les résultats obtenus pour le séquençage d'ADN plasmidique
25 avec le terminateur de chaîne de l'invention (courbe en trait plein) et avec le terminateur de chaîne de l'art antérieur (courbe en tirets).

La figure 2 est un diagramme illustrant les résultats obtenus en testant les morpholino A putrescine
30 (MATPP) et morpholino A fluorescéine (MATPPF) en séquençage.

La figure 3 est un schéma illustrant le résultat sur gel de polyacrylamide d'un test permettant de suivre l'allongement d'un oligonucléotide A et l'incorporation de morpholino A putrescine.

5 Exposé détaillé des modes de réalisation

Les exemples 1 à 4 qui suivent, illustrent la synthèse de morpholino-nucléotides de formule (I).

Exemple 1 : Synthèse de la 4-(carboxyméthyl)-2-(adénosin-9-yl)-6-(hydroxyméthyl)morpholine-6-triphosphate

10 (morpholino A glycine) 1.

Cette morpholino A glycine 1 répond à la formule (I) dans laquelle R¹ est l'adénine et R² est le groupe -CH₂-COOH.

15 Dans cet exemple, toutes les réactions sont conduites à la température ambiante, sous agitation magnétique, dans un ballon de 50 mL.

On dissout 1,000 g, (1,8 mmol, 1 éq.) de 5'-adénosine triphosphate dans 10 mL d'eau, puis on ajoute 1 éq. de periodate de sodium (388 mg, 1,8 mmol).

20 La solution est alors agitée pendant 35 minutes.

La glycine (682 mg, 9,1 mmol, 5 éq.) en solution dans 2 mL d'eau (pH = 9,5-10) est ajoutée et l'on remonte le pH de la solution à 9,5-10 avec du carbonate de potassium solide. La solution est agitée pendant 55 minutes. Le mélange réactionnel jaunit.

Du borohydrure de sodium (au total 166 mg, 4,4 mmol, 2,5 éq.) est ajouté en six fractions équivalentes, chacune dissoute dans 0,2 mL d'eau. Après ajout de la première, on note un dégagement gazeux. Les

autres fractions, chacune dissoute juste avant ajout, sont additionnées toutes les heures.

Après une nuit, la solution est neutralisée par ajout d'acide formique 1M jusqu'à pH 4-5, puis elle 5 est évaporée.

Une analyse par chromatographie en polarité de phase inversée sur une colonne Merck LiChrocart 125-4 LiChrospher 100 RP-18 ("endcapped", 5 µm, 125x4 mm) en utilisant un débit de 1 mL/min et l'éluant acétate de 10 triéthylammonium TEAA 25mM/méthanol MeOH [98/2], indique un rendement de 40 % (k' = 3,85).

Purification : elle est faite par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) préparative en utilisant une colonne Macherey Nagel Nucléosil 7 C-18 15 7 µm, 250x21 mm) avec un débit de 8 mL/min et du bicarbonate de triéthylammonium TEAB 25mM, comme éluant.

Caractérisation :

- RMN ^1H : δ (ppm) : 8,47 (s, 1H, H2), 8,37 (s, 20 1H, H8), 6,26 (dd, 1H, H1'), 4,54 (m, 1H, H4'), 4,28 (m, 1H, H5"), 4,22 (m, 1H, H5'), 3,70 (m, 1H, H2'), 3,68 (s, 2H, CH₂-Glycine), 3,41 (m, 1H, H2"), 3,45 (m, 1H, H3'), 3,30 (m, 1H, H3") ,

- RMN ^{13}C : δ (ppm) : 152,7 (C2), 140,5 (C8), 78,6 (C1'), 74,1 (C4'), 66,4 (C5'), 60,6 (CH₂), 54,5 (C2'), 25 53,6 (C3')

- RMN ^{31}P : δ (ppm) : -6,44 (d, 1P, γP), -11,68 (d, 1P, αP), -22,11 (t, 1P, βP)

- Spectrométrie de masse : M-H⁻ = 547,04 g.mol⁻¹

Exemple 2 : Synthèse de la 4-(carboxyméthyl)-2-(thymidin-1-yl)-6-(hydroxyméthyl)morpholine-6-triphosphate (morpholinoT glycine) 4.

Ce composé 4 répond à la formule (I) avec R¹ 5 représentant la thymine et R² représentant le groupe -CH₂-COOH.

Dans cet exemple, on prépare tout d'abord le morpholino-nucléoside, puis on le transforme en triphosphate.

10 a) Préparation du morpholino-nucléoside de la ribothymidine 2.

Toutes les réactions sont conduites à la température ambiante, sous agitation magnétique, dans un ballon de 250 mL.

15 La ribothymidine (3,500 g, 13,5 mmol, 1 éq) est dissoute dans 35 mL d'eau, puis est additionnée de 1 éq. de periodate de sodium (2,900 g, 13,5 mmol). La solution est alors agitée pendant 45 minutes.

20 La glycine (5,089 g, 67,8 mmol, 5 éq) dans 35 mL d'eau (pH = 9,5-10) est ajoutée et le pH de la solution est remonté à 9,5-10 avec du carbonate de potassium. La solution est agitée pendant une heure et 45 minutes. Le mélange réactionnel jaunit.

25 Un sixième de borohydrure de sodium (au total 1,280 g, 33,8 mmol, 2,5 éq) dissous dans 3,5 mL d'eau est ajouté à la solution. On note un dégagement gazeux. Les autres sixièmes, chacun dissous juste avant ajout, sont additionnés toutes les heures.

30 Après une nuit, la solution est neutralisée par ajout d'acide formique 1M jusqu'à pH4-5, puis elle est évaporée.

Une analyse par chromatographie en polarité de phase inversée sur colonne Merck LiChrocart 125-4 LiChrospher 100 RP-18 ("endcapped", 5µm, 125x4 mm), avec un débit de 1 mL/min, en utilisant comme éluant : TEAA 5 25mM/MeOH [99/1], indique un rendement de 32% ($k' = 8,83$).

Purification : elle est faite par chromatographie "flash" sur une colonne de silice à polarité de phase inversée C-18 (Matrex, Amicon). L'éluant est de l'eau.

10

Caractérisation :

- RMN ^1H : δ (ppm) : 7,77 (s, 1H, H6), 5,92 (dd, 1H, H1'), 4,07 (m, 1H, H4'), 3,77 (m, 2H, H5', H5"), 3,22 (s, 2H, CH₂ glycine), 3,13 (dd, 1H, H2"), 2,99 (dd, 1H, H3"), 2,51 (t, 1H, H2'), 2,34 (t, 1H, H3'), 1,98 (s, 3H, CH₃ base).

b) Préparation du morpholino-nucléoside monophosphate de la ribothymidine 3.

20 A 342 mg d'imidazole (5,0 mmol, 3 éq) séchés au dessicteur puis repris dans 5 mL de pyridine rigoureusement anhydre, sont additionnés 234 µL d'oxychlorure trichlorure de phosphore (2,5 mmol, 1,5 éq.). Le mélange est placé sous agitation pendant 25 30 minutes sous air sec.

Parallèlement, 500 mg de la morpholinothymidine (1,7 mmol, 1 éq.) obtenue en a) sont séchés 3 fois dans la pyridine, puis repris dans 5 mL de pyridine anhydre.

30 Le mélange imidazole/POCl₃/pyridine sous argon est additionné à la solution de morpholinonucléoside et l'ensemble est placé sous agitation pendant 48 heures à

température ambiante. Puis 100 µL d'eau sont ajoutés en prenant soin de refroidir le ballon réactionnel dans un bain de glace. Le mélange réactionnel est évaporé à sec puis repris 2 fois avec de l'eau et évaporé afin 5 d'éliminer la pyridine.

Une analyse par chromatographie en polarité de phase inversée sur colonne Macherey Nagel Nucléosil 5 C-18 (7 µm, 120x3 mm), à un débit de : 1 mL/min, en utilisant comme éluant : TEAA 25mM-MeOH [97/3], indique 10 un rendement de 33% ($k' = 0,62$).

Purification : elle est faite par HPLC préparative sur H : colonne Macherey Nagel Nucléosil 7 C-18 (7 µm, 250x21 mm) à un débit de 5 mL/min en utilisant l'eau 15 comme éluant.

Caractérisation :

- RMN ^1H : δ (ppm) : 7,80 (s, 1H, H6), 5,95
20 (dd, 1H, H1'), 4,19 (m, 1H, H4'), 3,94 (t, 2H, H5', H5"),
3,28 (s, 2H, CH₂ glycine), 3,24 (m, 1H, H2"), 3,10 (m, 1H,
H3"), 2,53 (t, 1H, H2'), 2,39 (t, 1H, H3'), 2,00 (s, 3H,
CH₃ base)

- RMN ^{31}P : δ (ppm) : 1,74 (s)

25 c) Préparation du morpholino-nucléoside triphosphate de la ribothymidine 4.

1,097 g de carbonyldiimidazole (6,7 mmol,
5 éq.) dissous dans 5 mL de diméthylformamide anhydre
sont additionnés au sel de tributylammonium du
30 morpholinonucléoside monophosphate de la thymine
3 obtenue en b) (511 mg, 1,3 mmol, 1 éq.) dissous dans
3 mL de diméthylformamide anhydre. Le mélange est placé

sous agitation à température ambiante pendant cinq heures. L'excès de carbonyldiimidazole est détruit par ajout de 436 µL de méthanol (10,8 mmol, 8 éq.). Après 30 minutes, 5 équivalents de pyrophosphate de tributylammonium (3,008 g, 6,7 mmol) en solution dans 5 mL de diméthylformamide sont ajoutés. Le mélange est placé sous agitation pendant deux jours, puis le mélange réactionnel est filtré et évaporé à sec.

Une analyse par chromatographie en polarité de phase inversée est effectué sur une colonne SFCC PVDI 31 (5 µm, 100x4,6 mm), à un débit de 1 mL/min, en utilisant comme éluant un gradient de formiate d'ammonium (FA), dans les conditions suivantes :

t(min)	FA 25 mM	FA 0,9 M
	(%)	(%)
0	100	0
10	100	0
40	0	100
41	0	100
43	100	0

15

Ceci indique un rendement de 27% ($k'=13,84$).

Purification : elle est faite par chromatographie "flash" sur une colonne de phase échangeuse d'ions (DEAE Sepharose Fast Flow, Pharmacia Biotech). L'éluant est un gradient de TEAB (de 25 mM à 0,9 M).

Caractérisation :

- RMN ^1H : δ (ppm) : 7,74 (s, 1H, H6), 5,92 (dd, 1H, H1'), 4,25 (m, 1H, H4'), 4,15 (m, 2H, H5', H5''), 3,81 (s, 2H, CH₂ glycine), 3,54 (d, 1H, H2''), 3,10 (t, 1H, H3''), 2,56 (t, 1H, H2'), 2,45 (t, 1H, H3'), 1,95 (s, 3H, CH₃ base)

- RMN ^{31}P : δ (ppm) : -10,03 (d, 1P, γP), -10,88 (d, 1P, αP), -22,65 (t, 1P, βP)

- Spectrométrie de masse : M-H⁻ = 540,41 g.mol⁻¹

10

Exemple 3 : Synthèse de la 4-(carboxyméthyl-2-(guanin-9-yl)-6-(hydroxyméthyl) morpholine-6-triphosphate (morpholino G glycine) 5.

Cette morpholino G glycine 5 répond à la formule (I) avec R¹ = guanine et R² = -CH₂COOH.

La guanosine,5'4riphosphate (50 mg, 0,08 mmol, 1 éq.) est dissoute dans 2 mL d'eau, puis est additionnée de 1 éq. de periodate de sodium (18 mg, 0,08 mmol). La solution est alors agitée pendant 35 minutes. La glycine (31 mg, 0,42 mmol, 5 éq.) en solution dans 2 mL (pH = 9,5-10) est ajoutée et l'on remonte le pH de la solution à 9,5-10 avec du carbonate de potassium solide (contrôle avec du papier pH). La solution est agitée pendant 45 minutes. Du borohydrure de sodium (au total 8 mg, 0,21 mmol, 2,5 éq.) est ajouté en six fractions équivalentes, chacune dissoute dans 0,1 mL d'eau. Les autres fractions, chacune dissoute juste avant ajout, sont additionnées toutes les heures. Après une nuit, la solution est neutralisée par ajout d'acide formique 1M jusqu'à pH 4-5, puis elle est évaporée.

Une analyse par chromatographie en polarité de phase inversée (Système E) sur colonne SFCC PVDI 31

23

(5 µm, 100 x 4,6 mm) avec un débit : 1 mL/min, en utilisant comme éluant un gradient de formiate d'ammonium, dans les conditions suivantes :

t(min)	FA 25 mM (%)	FA 1 M (%)
0	100	0
3	100	0
10	0	100
15	0	100
17	100	0

5

Cette analyse donne un rendement de 39 % ($k' = 5,5$).

On purifie le composé 5 par HPLC préparative en utilisant le système F : Colonne Vydac Sax-Protéin (8 µm) 10 100 x 4,6 mm). Débit : 10 mL/min. Eluant : gradient de formiate d'ammonium, dans les conditions suivantes :

t(min)	FA 25 mM (%)	FA 1 M (%)
0	100	0
3	100	0
10	0	100
15	0	100
17	100	0

On obtient 14 mg du composé 5, soit 26,1 % de 15 rendement.

Caractérisation :

- RMN ^1H (AM 400 Brüker) : δ (ppm) : 8,07 (s, 1H, H8) ; 6,06 (dd, 1H1, H1') 4,51 (m, 1H, H4') ; 4,22 (m, 2H, H5', H5") ; 3,71 (m, 1H, H2") ; 3,67 (s, 2H, -CH₂ glycine) ; 3,46 (m, 1H, H3") ; 3,38 (m, 1H, H2') ; 2,95 (m, 1H, H3').

- RMN ^{13}C (AM 400 Brüker) : δ (ppm) : 173,50 (-COOH) ; 158,91 (C6) ; 153,98 (C2) ; 151,07 (C4) ; 137,39 (C8) ; 115,94 (C5) ; 77,87 (C 1') ; 73,62 (C4') ; 65, 61 (C5') ; 59,98 (-CH₂-) ; 53,28 (C2') ; 51,88 (C3').

- RMN ^{31}P (U 400 Varian) : δ (ppm) : -7,14 (d, 1P, γP) ; 8,68 (d, 1P, αP) ; -20,28 (t, 1P, βP).

- Spectrométrie de masse (appareil LCQ en mode positif) : M+H⁺ = 564,9 g.mol⁻¹.
- Spectre UV : $\lambda_{\text{max}} = 256$ nm.
- Electrophorèse capillaire :
 $\mu\text{ep} = -4,28 \times 10^{-4} \text{ cm}^2.\text{V}^{-1}.\text{s}^{-1}$.

Exemple 4 : Synthèse de la 4-(carboxyméthyl)-2-(cytosin-1-yl)-6-(hydroxyméthyl) morpholine-6-triphosphate (morpholino C glycine) 6.

Le composé 6 répond à la formule (I) avec R¹ = cytosine et R² = -CH₂-COOH.

Toutes les réactions sont conduites à température ambiante, sous agitation magnétique, dans un ballon de 20 mL.

La réaction est la même que pour le composé 5 partir de la 5'-cytosine triphosphate (50,0 mg, 0,09 mmol, 1 éq.), de periodate de sodium (21 mg, 0,09 mmol, 1 éq.), de la glycine (36 mg, 0,48 mmol,

5 éq.) en solution dans 2 mL d'eau (pH = 9,5-10), du borohydrure de sodium (au total 9 mg, 0,23 mmol, 2,5 éq.), ajouté en six fractions équivalentes, chacune dissoute dans 0,05 mL d'eau.

5 Une analyse par chromatographie sur colonne de phase échangeuse d'ions (système E) comme dans l'exemple 3, indique un facteur de capacité $k'=4,08$.

10 On purifie le produit par HPLC semi-préparative en utilisant le système F comme dans l'exemple 3.

17 mg de produit sont isolés, ce qui correspond à 24,3 % de rendement.

Caractérisation :

15 - RMN ^1H (AM 400 Brüker) : δ (ppm) : 7,93 (d, 1H, H6) ; 6,25 (dd, 1H, H1') ; 6,20 (d, 1H, H5) ; 4,51 (m, 1H, H4') ; 4,27 (m, 2H, H5', H5") ; 3,85 (m, 4H, H2" + H3" + -CH₂ glycine) ; 3,33 (t, 1H, H2') ; 3,22 (t, 1H, H3').

20 - RMN ^{13}C (AM 400 Brüker) : δ (ppm) : 173,05 (-COOH) ; 165,13 (C4) ; 154,23 (C2) ; 140,93 (C6) ; 95,48 (C5) ; 80,42 (C1') ; 78,44 (C4') ; 69,37 (C5') ; 64,57 (-CH₂-) ; 54,66 (C2') ; 53,67 (C3').

25 - RMN ^{31}P (WM 250 Brüker) : δ (ppm) : -7,99 (d, 1P, γP) ; -10, 10 (d, 1P, αP) ; -21,28 (t, 1P, βP).

- Spectrométrie de masse

(appareil VG ZAB-2-EQ, mode négatif) :

$$\text{M} - \text{H}^- = 521,9 \text{ g.mol}^{-1}$$

30 - Spectre UV : $\lambda_{\text{max}} = 270 \text{ nm}$

- Electrophorèse capillaire :

$$\mu_{\text{ep}} = -4,28 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$$

Exemple 5 : Synthèse de la 4-(aminobutyl)-2-(adénosin-9-yl)-6-(hydroxyméthyl)morpholine-6-triphosphate (morpholino A putrescine) 7.

Cette morpholino A putrescine 7 répond à la
5 formule (I) avec R¹ représentant l'adénine et R²
représentant le groupe -(CH₂)₄-NH₂.

Toutes les réactions sont conduites à la température ambiante, sous agitation magnétique, dans un ballon de 100 mL.

10 La 5'-adénosine triphosphate (500 mg, 0,9 mmol, 1 éq.) est dissoute dans 10 mL d'eau, puis est additionnée de 1 éq. de periodate de sodium (194 mg, 0,9 mmol). La solution est alors agitée pendant 45 minutes.

15 La putrescine (456µL, 4,5 mmol, 5 éq.) est ajoutée. La solution est agitée pendant 45 minutes. Le mélange réactionnel jaunit.

20 Un sixième de borohydrure de sodium (au total 86 mg, 2,3 mmol, 2,5 éq.) dissous dans 0,1 mL d'eau est ajouté à la solution. On note un dégagement gazeux. Les autres sixièmes, chacun dissous juste avant ajout, sont additionnés toutes les heures.

25 Après une nuit, la solution est neutralisée par ajout d'acide formique 1M jusqu'à pH4-5, puis elle est évaporée.

On effectue une analyse par chromatographie en polarité de phase inversée sur colonne Merck LiChrocart 125-4 LiChrospher 100 RP-18 ("endcapped", 5 µm, 125x4mm) avec un débit de 1 mL/min, en utilisant comme éluant un 30 gradient TEAB 25mM/MeOH, dans les conditions suivantes :

t(min)	TEAB (%)	MeOH (%)
0	97	3
2	97	3
10	90	10
15	90	10
17	97	3

Cette analyse indique un rendement de 67 % ($k' = 3,81$).

On purifie le produit 7 par HPLC semi-préparative sur la colonne Phenomenex Ultremex 5-C18 (250x10 mm) avec un débit de 4 mL/min, et en utilisant comme éluant un gradient TEAB 25 mM/MeOH, dans les conditions suivantes :

10

t(min)	TEAB (%)	MeOH (%)
0	95	5
3	95	5
8	90	10
10	95	5

Caractérisation :

- RMN ^1H : δ (ppm) : 8,44 (s, 1H, H2), 8,33 (s, 1H, H8), 6,06 (dd, 1H, H1'), 4,35 (m, 1H, H4'), 4,22 (m, 2H, H5', H5"), 3,39 (d, 1H, H2'), 3,22 (t, 1H, H3").

15

3,14 (s, 2H, CH₂ putrescine), 2,92 (t, 1H, H2'), 2,74 (s, 2H, CH₂ putrescine), 2,54 (t, 1H, H3'), 1,78 (s, 4H, (CH₂)₂ putrescine) .

- RMN ³¹P : δ (ppm) : -8,45 (dd, 1P, γP),

5 -13,25 (dd, 1P, αP), -24,20 (t, 1P, βP)

- Spectrométrie de masse : M+H⁺ = 561,92

g.mol⁻¹

Exemple 6 : Synthèse de la 4-(aminobutyl)-2-(thymidin-1-yl)-6-(hydroxyméthyl) morpholine-6-triphosphate (morpholino T putrescine) 9.

Le composé 9 répond à la formule (I) avec R¹ = thymine et R² = -(CH₂)₄-NH₂.

15 a) Préparation de la 4-(aminobutyl)-2-(thymidin-1-yl)-6-(hydroxyméthyl) morholine-6-hydroxyle 8.

Toutes les réactions sont conduites à température ambiante, sous agitation magnétique, dans un ballon de 250 mL.

20 La ribothymidine (2,000 g, 7,74 mmol, 1 éq.), est dissoute dans 30 ml d'eau, puis est additionnée de 1 éq. (1,656 g, 7,75 mmol) de periodate de sodium. La solution est alors agitée pendant 70 minutes. La putrescine (3,9 ml, 38,75 mmol, 5 éq.) est 25 ajoutée. La solution est agitée pendant 50 minutes. Le mélange réactionnel jaunit.

Un sixième de borohydrure de sodium (au total 735 mg, 19,42 mmol, 2,5 éq.) dissous dans 0,25 mL d'eau est ajouté à la solution. On note un dégagement gazeux. 30 Les autres sixièmes, chacun dissous juste avant ajout dans 0,25 mL d'eau sont additionnés toutes les heures.

Après une nuit, la solution est neutralisée par ajout d'acide formique 1M jusqu'à pH 4-5, puis elle est évaporée.

On effectue une analyse par chromatographie en polarité de phase inversée en utilisant le système G : colonne Merck-LiChrocart 125-4 LiChrospher 100 RP-18 (« endcapped », 5 µm, 125 x 4 mm). Débit : 1 mL/min. Eluant : gradient TEAB 25 mM/CH₃CN, dans les conditions suivantes :

t(min)	TEAB 25 mM (%)	CH ₃ CN (%)
0	100	0
4	100	0
15	85	15
18	100	0

10

Ceci indique un rendement de 76 % (*k'* = 5,7).

On purifie par HPLC préparative en utilisant le système H : colonne Macherey Nagel Nucléosil 7 C-18 (7 µm, 250 x 21 mm). Débit : 10 mL/min. Eluant : TEAB 15 25 mM / CH₃CN [85/15].

On obtient 1,56 g du composé **8**, soit 64,6 % de rendement.

Caractérisation :

20 - RMN ¹H (AC 200 Brüker) : δ (ppm) : 7,69 (s, 1H, H6) ; 5,88 (dd, 1H, H1') ; 4,01 (m, 1H, H4') ; 3,80 (m, 1H, H5', H5") ; 3,08 (m, 4H, H2'', H3'', 2Ha) ; 2,63 (m, 2H, 2 Hd) 2,33 (t, 1H, H2') ; 2,22 (t, 1H, H3') ; 1,98 (m, 3H, -CH₃) ; 1,74 (m, 4H, 2 Hb, 2 Hc).

30

- RMN ^{13}C (AC 200 Brüker) : δ (ppm) : 171,16
(C2) ; 154,58 (C4) ; 135,93 (C6) ; 110,46 (C5) ; 78,62
(C1') ; 75,04 (C4') ; 61,10 (C5') ; 55,82 (C3') ; 53,49
(C2') ; 51,30 (Ca) ; 38,39 (Cd) ; 24,50 (Cc) ; 21,31
5 (Cb) ; 11,10 (-CH₃) .

- Spectre UV : $\lambda_{\text{max}} = 266 \text{ nm.}$

10 b) Préparation de la 4-(aminobutyl)-2-(thymidin-1-yl)-6-(hydroxyméthyl)morpholine-6-triphosphate 9.

La morpholinothymidine/putrescine **8** (249 mg, 0,80 mol, 1 éq.) est séchée à la pompe à palette pendant 1 heure. On ajoute ensuite 256 mg de Proton-sponge® (1,19 mmol, 1,5 éq.) et l'on additionne 2 mL de triméthylphosphate anhydre ; on place le milieu dans un bain de glace, sous agitation, puis on additionne 109 µL d'oxychlorure de phosphore (au total 2,24 mmol, 2,8 éq.). Après 2 h 30, on additionne à nouveau 50 mL d'oxychlorure de phosphore, et l'on recommence 12 h après. Puis, on ajoute 8 mL d'une solution 0,5 M de pyrophosphate sous forme de sel de tributylammonium (4,0 mmol, 5 éq.), dans le DMF anhydre. On laisse sous agitation à 0°C pendant une minute, puis le milieu est séché au rotavapeur et pompe à palette.

25 Une analyse par chromatographie en polarité de phase inversée en utilisant le système I : colonne Vydac Sax-Protein (8 µm, 100 x 4,6 mm) avec un débit : 10 mL/min en utilisant comme éluant un gradient de formiate d'ammonium, dans les conditions suivantes :

t(min)	FA 25 mM (%)	FA 1M (%)
0	100	0
1	100	0
15	70	30
17	100	0

Elle indique un facteur de capacité $k' = 3,2$.

5 On purifie par HPLC préparative en utilisant le système I décrit ci-dessus.

On obtient 48 mg de **9**, soit 13,2 % de rendement.

10 Caractérisation :

- RMN ^1H (AM 400 Brüker) : δ (ppm) : 7,83 (s, 1H, H6) ; 6,31 (dd, 1H, H1') ; 4,68 (m, 1H, H4') ; 4,39 (m, 1H, H5', H5") ; 4,01 (d, 1H, H2") ; 3,93 (d, 1H, H3") ; 3,58 (m, 2H, 2 Ha) ; 3,51 (t, 1H, H2') ; 3,41 (m, 1H, H3') ; 3,28 (m, 2H, 2 Hd) ; 2,10 (s, 5H, -CH₃ + 2 Hb) ; 2,00 (m, 2H, 2Hc).

- RMN ^{13}C (Am 400 Bruker) : δ (ppm) : 166,36 (C2) ; 151,03 (C4) ; 136,73 (C6) ; 112,42 (C5) ; 77,33 (Cl') ; 72,46 (C4') ; 65,10 (C5') ; 57,04 (C3) ; 51,71 (C2') ; 51,13 (Ca) ; 98,91 (Cd) ; 23,85 (Cc) ; 20,50 (Cb) ; 11,62 (-CH₃).

- RMN ^{31}P (U 400 Varian) : δ (ppm) : -8,19 (s, 2P, γP, αP) ; -18,99 (t, 1P, βP).

- Spectrométrie de masse (appareil LCQ en mode négatif) : M - H⁻ = 551,3 g.mol⁻¹.

- Spectre UV : $\lambda_{\text{max}} = 262$ nm.

- Electrophorèse capillaire :

$$\mu_{\text{ep}} = -4,69 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}.$$

Exemple 7 : Synthèse de la 4-(aminobutyl)-2-(guanosin-9-y1)-6-(hydroxyméthyl morpholine-6-triphosphate (morpholino G putrescine) 10.

Le composé 10 répond à la formule (I) avec R¹ = guanine et R² = -CH₂)₄-NH₂-.

Toutes les réactions sont conduites à température ambiante, sous agitation magnétique, dans un ballon de 50 mL.

La guanosine,5'-triphosphate (50 mg, 0,17 mmol, 1 éq.) est dissoute dans 5 mL d'eau, puis est additionnée de 1 éq. de periodate de sodium (37 mg, 0,17 mmol, 1 éq.). La solution est alors agitée pendant 30 minutes.

La putrescine (85 µL, 0,84 mmol, 5 éq.) est ajoutée et l'on mesure le pH de la solution qui est égal à 10. Si une valeur inférieure avait été trouvée, on aurait ajouté du carbonate de potassium pour obtenir cette valeur. La solution est agitée pendant 45 minutes.

Du borohydrure de sodium (au total 8,7 mg, 0,45 mmol, 2,5 éq.) est ajouté en six fractions équivalentes, chacune dissoute dans 0,1 mL d'eau. Les autres fractions, chacune dissoute juste avant ajout, sont additionnées toutes les heures.

Après une nuit, la solution est neutralisée par ajout d'acide formique 1M jusqu'à pH 4-5, puis elle est évaporée.

On purifie le composé 10 par précipitation au méthanol, puis passage sur 5 mL de résine Dowex sous forme Na⁺.

On obtient 68 mg de composé 10, soit un rendement de 62,2 %.

Caractérisation :

5 - RMN ^1H (AM 400 Brüker) : δ (ppm) : 8,29 (s, 1H, H8) ; 6,31 (dd, 1H, H1') ; 4,74 ((m, 1H, H4') ; 4,37 (m, 2H, H5', H5") ; 3,99 (m, 1H, H2") ; 3,96 (m, 1H, H3") ; 3,79 (t, 1H, H2') ; 3,47 (m, 2H, 2 Hb) ; 3,39 (t, 1H, H3') ; 3,19 (m, 2H, 2 Hc) ; 2,06 (m, 2H, 2 Ha) ; 1,91 (m, 2H, 2 Hd).

10 - RMN ^{13}C (AM 400 Brüker) : δ (ppm) : 151,11 (C6) ; 154,11 (C2) ; 149,91 (C4) ; 136,95 (C8) ; 113,46 (C5) ; 76,99 (C1') ; 72,58 (C4') ; 65,25 (C5') ; 56,95 (Ca) ; 51,81 (C2') ; 50,52 (C3') ; 30,04 (Cd) ; 23,76 (Cc) ; 20,36 (Cb).

15 - RMN ^{31}P (U 400 Varian) : δ (ppm) : -8,28 (d, 1P, γP) ; -8,97 (d, 1P, αP) ; -20,45 (t, 1P, βP).

20 - Spectrométrie de masse (appareil LCQ en mode négatif) : $M - \text{H}^- = 576,9 \text{ g.mol}^{-1}$.
 - Spectre UV : $\lambda_{\text{max}} = 252 \text{ nm}$.
 - Electrophorèse capillaire :
 $\mu_{\text{ep}} = -3,41 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

25 **Exemple 8 : Synthèse de la 4-(aminobutyl)-2-(cytosin-1-yl)-6-(hydroxyméthyl morpholine-6-triphosphate (morpholino C putrescine : 11**

30 Toute la réaction est conduite à température ambiante, sous agitation magnétique, dans un ballon de 50 mL.

Toute la réaction est la même que pour le composé 7, à partir de la cytosine,5'-triphosphate (50 mg,

0,09 mmol, 1 éq.), de periodate de sodium (20 mg, 0,09 mmol, 1 éq.), de la putrescine (47 µL, 0,47 mmol, 5 éq), du borohydrure de sodium (au total 9,1 mg, 0,24 mmol, 2,5 éq.) ajouté en six fractions équivalentes, 5 chacune dissoute dans 0,1 mL d'eau.

Une analyse par chromatographie en polarité de phase inversée (système O) : colonne Merck Lichrocart 125-4 LiChrospher 100RP-18 ("endcapped", 5 µm, 125x4 mm). Débit : 1 mL/min. Eluant : gradient TEAB 25 mM/MeOH, dans 10 les conditions suivantes :

t (min)	TEAB 25 mM (%)	MeOH (%)
0	97	3
2	97	3
10	90	10
15	90	10
17	97	3

15 ... indique un facteur de capacité $k' = 4,18$.

On purifie le composé 11 par précipitation au méthanol, puis passage sur 5 mL de résine Dowex sous forme Na^+ .

On obtient 47 mg de 11, ce qui correspond à 20 85,4 % de rendement.

Caractérisation :

- RMN ^1H (AM 400 Brüker) : δ (ppm) : 7,78 (d, 25 1H, H6) ; 6,17 (d, 1H, H5) ; 5,96 (dd, 1H, H1') ; 4,22 (m, 1H, H4') ; 3,91 (m, 2H, H5', H5") ; 3,28 (m, 1H, H2") ; 3,20 (m, 1H, H3") ; 3,16 (m, 2H, 2 Ha) ; 2,80 (m,

2H, 2 Hd) ; 2,44 (m, 1H, H2') ; 2,32 (m, 1H, H3') ;
1,79 (m, 4H, 2 Hb + 2 Hc)

- RMN ^{13}C (AM 400 Brüker) : δ (ppm) : 166,056
(C4) ; 157,28 (C2) ; 142,43 (C6) ; 96,88 (C5) ; 80,57
5 (Cl') ; 75,13 (C4') ; 66,48 (C5') ; 57,11 (Ca) ; 55,30
(C2') ; 52,45 (C3') 30,66 (Cd) ; 25,29 (Cc) ; 22,70 (Cb).

- RMN ^{31}P (WM 250 Brüker) : δ (ppm) : -5,42
(d, 1P, γP) ; -10,06 (d, 1P, αP) ; -20,82 (m, 1P, βP).

- 10 - Spectrométrie de masse (appareil LCQ en mode négatif) : $M - \text{H}^- = 536,0 \text{ g.mol}^{-1}$.
- Spectre UV : $\lambda_{\text{max}} = 268 \text{ nm}$
- Electrophorèse capillaire :
 $\mu_{\text{ep}} = -2,99 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

15

Exemple 9 : Synthèse de la 4-[5((2-aminobutyl)-thiouréidyl)fluorescein]-2-(adénosin-9-yl)-6-(hydroxyméthyl)-morpholine-6-triphosphate (morpholino A putrescine-fluorescéine) 12.

20 Ce composé 12 répond à la formule (I) avec R¹ représentant l'adénine, et R² représentant $(\text{CH}_2)_4\text{NHR}^3$ où R³ est un groupe dérivé de la fluorescéine.

Toutes les réactions sont conduites à la température ambiante, sous agitation magnétique, dans un 25 ballon de 100 mL.

On ajoute en trois fois et progressivement à 200 mg (0,3 mmol, 1 éq.) de la Morpholino A putrescine 7 de l'exemple 5, dans un mélange eau/pyridine (1/1), 184,9 mg (0,5 mmol, 1,5 éq.) de fluorescéine 30 isothiocyanate. Le milieu est agité pendant 48 heures avant d'être évaporé à sec.

Une analyse par chromatographie en polarité de phase inversée sur la colonne Merck LiChrocart 125-4 LiChrospher 100 RP-18 ("endcapped", 5 µm, 125x4 mm), avec un débit de 1 mL/min en utilisant comme 5 éluant : TEAA 25mM/MeOH [97/3], indique un rendement d'environ 48% ($k' = 7,51$).

10 Purification : elle est faite par chromatographie "flash" sur une colonne de silice à polarité de phase inversée C-18 (Econosil prep 90, Alltech, France). L'éluant est un gradient eau/MeOH.

Caractérisation :

15 - RMN ^1H : δ (ppm) : 8,57 (s, 1H, H2), 8,31 (s, 1H, H8), 8,20-6,65 (9H, fluorescéine), 5,79 (dd, 1H, H1'), 4,25 (m, 1H, H4'), 4,11 (m, 2H, H5', H5"), 3,60 (s, 2H, CH₂ putrescine), 3,12 (d, 1H, H3"), 2,93 (d, 1H, H2"), 2,81 (m, 1H, H2'), 2,59 (m, 2H, CH₂ putrescine), 2,50 (dd, 1H, H3'), 1,79 (s, 2H, CH₂ putrescine), 1,62 (m, 2H, CH₂ putrescine)

20 - RMN ^{31}P : δ (ppm) : -8,45 (dd, 1P, γP), -13,25 (dd, 1P, αP), -24,20 (t, 1P, βP)

Spectrométrie de masse : M-H⁻ = 949,2 g.mol⁻¹

25 Exemple 10 : Synthèse de la 4-[5(((2-aminobutyl)-thioureidyl) fluorescein)1-2-(thymidin-1-yl)-6-(hydroxyméthyl) morpholine-6-triphosphate (morpholino T putrescine fluorescéine) 13.

30 Toutes les réactions sont conduites à température ambiante, sous agitation magnétique, dans un ballon de 25 mL.

A 30 mg (0,05 mmol, 1 éq) du composé **9** dissous dans 2 mL d'un mélange eau/pyridine (1/1), on ajoute en trois fois 31 mg (0,08 mmol, 1,5 éq.) de fluorescéine isothiocyanate. Le milieu est agité pendant 48 heures 5 avant d'être évaporé à sec.

On purifie le composé **13** par chromatographie liquide hautes performances semi-préparative, sur une colonne à polarité de phases inversée (Système L) : colonne Macherey Nagel Nucléosil 7 C-18 (7 µm, 250 x 21 10 mm). Débit : 10 mL/min. Eluant : TEAB 25 mM/CH₃CN, dans les conditions suivantes :

t(min)	TEAB 25 mM (%)	CH ₃ CN (%)
0	100	0
4	100	0
15	73	27
18	100	0

15 Caractérisation :

- Spectrométrie de masse (appareil LCQ en mode positif) : M-H⁺ = 942,1 g.mol⁻¹.
- Spectre UV : λ_{max} = 488 nm.
- Electrophorèse capillaire :

$$20 \quad \mu\text{cp} = -4,23 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}.$$

Exemple 11 : Synthèse de la 4-[5(((2-aminobutyl)-thioureidyl) fluorescein)]-2-(guanosin-9-yl)-6-(hydroxyméthyl) morpholine-6-triphosphate (morpholino G putrescine fluorescéine) 14.

5 Toutes les réactions sont conduites à température ambiante, sous agitation magnétique, dans un ballon de 25 mL.

10 A 30 mg (0,05 mmol, 1 éq.) du composé 10, dissous dans 2 mL d'un mélange eau/pyridine (1/1), on ajoute en trois fois et progressivement 30 mg (0,08 mmol, 1,5 éq.) de fluorescéine isothiocyanate. Le milieu est agité pendant 48 heures avant d'être évaporé à sec.

15 Une analyse par chromatographie en polarité de phase inversée (système M) : colonne Merck-LiChrochart 125-4 LiChrospher 100 RP-18 (« endcapped », 5 µm, 125 x 4 mm). Débit : 1 mL/min. Eluant : gradient TEAB 25 mM/CH₃CN, dans les conditions suivantes :

t(min)	TEAB 25 mM (%)	CH ₃ CN (%)
0	100	0
4	100	0
15	73	27
18	100	0

20 indique un rendement d'environ 24 % (*k'* = 4,62).

On purifie le composé 14 par chromatographie liquide hautes performances semi-préparative, sur une colonne à polarité inversée en utilisant le Système L de l'exemple 10.

25 On obtient 14,5 mg de composé 14, soit un rendement de 30,0 %.

Caractérisation :

- RMN ^1H (AM 400 Brüker) : δ (ppm) : 7,87 (s, 1H, H8) ; 7,70-6,63 (9H, fluorescéine) ; 5,60 (dd, 1H, H1') ; 4,18 (m, 1H, H4') ; 4,12 (m, 2H, H5', H5") ; 3,82 (m, 1H, Ha) ; 3,61 (m, 1H, Ha) ; 3,08 (d, 1H, H3") ; 2,95 (d, 1H, H2") ; 2,82 (m, 1H, H2') ; 2,71 (m, 1H, Hd) ; 2,55 (m, 1H, Hd) ; 2,39 (t, 1H, H3') ; 1,77 (m, 2H, 2 Hb) ; 1,62 (m, 2H, 2 Hc).

- RMN ^{13}C (AM 400 Brüker) : δ (ppm) : 180,58 (plusieurs C fluorescéine) ; 158,37 (plusieurs C fluorescéine) ; 136,98 (C6) ; 131,06 (C2) ; 126,7 (C4) ; 122,85 (plusieurs C fluorescéine) ; 112,03 (C8) ; 103,80 (plusieurs C fluorescéine) ; 78,91 (Cl') ; 74,83 (C4') ; 65,96 (C5') ; 57,27 (Ca) ; 53,79 (C2') ; 52,56 (C3') ; 48,87 (Cd) ; 25,70 (Cc) ; 22,75 (Cb).

- RMN ^{31}P (U 400 Varian) : δ (ppm) : -4,93 (dd, 1P, γP) ; -9,82 (d, 1P, αP) ; -19,94 (t, 1P, βP).

- Spectrométrie de masse (appareil LCQ en mode négatif) : $M - \text{H}^- = 985,3 \text{ g.mol}^{-1}$.

- Spectre UV : $\lambda_{\text{max}} = 494 \text{ nm}$

- Electrophorèse capillaire :

$$\mu_{\text{ep}} = -3,83 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}.$$

Exemple 12 : Synthèse de la 4-[5 (((2-aminobutyl)-thiouréidyl)fluorescein)]-2-(cytosin-1-yl)-6-(hydroxyméthyl)morpholino-6-triphosphate (morpholino C putrescine-fluorescéine) 15.

Toutes les réactions sont conduites à température ambiante, sous agitation magnétique, dans un ballon de 10 mL.

A 30 mg (0,05 mmol, 1 éq) du composé 11,

dissous dans 2 ml d'un mélange eau/pyridine (1/1), on ajoute en trois fois 36 mg (0,09 mmol, 1,5 éq.) de fluorescéine isothiocyanate. Le milieu est agité pendant 48 heures avant d'être évaporé à sec.

5 Une analyse par chromatographie en polarité de phase inversée (système M décrit dans l'exemple 11) indique un facteur de capacité $k'=4,7$.

10 On purifie le composé 15 par chromatographie liquide hautes performances semi-préparative, sur une colonne à polarité de phases inversée (Système L de l'exemple 10).

On obtient 22,7 mg du composé 15, soit un rendement de 44,3%.

15 Caractérisation :

- RMN ^1H (AM 400 Brüker) : δ (ppm) : 7,99 (s, 1H, H6) ; 7,87-6,69 (9H, fluorescéine) ; 5,78 (d, 2H, H5 + H1') ; 4,14 (m, 1H, H4') ; 3,77 (m, 2H, H5', H5") ; 3,36 (m, 2H, 2 Ha) ; 3,32 (m, 1H, H2") ; 3,03 (m, 1H, H3") ; 2,81 (m, 1H, H2') ; 2,69 (m, 2H, 2 Hd, 1,79) ; 2,30 (m, 1H, H3') ; 1,79 (m, 2H, 2 Hb) ; 1,68 (m, 2H, 2 Hc)

20 - RMN ^{13}C (AM 400 Brüker) : δ (ppm) : 175,06 (plusieurs C fluorescéine) ; 157,62 (C2) ; 141,39 (plusieurs C fluorescéine) ; 131,56 (C6) ; 121,06 (plusieurs C fluorescéine) ; 114,60 (plusieurs C fluorescéine) ; 103,30 (plusieurs C fluorescéine) ; 96,53 (C5) ; 79,10 (C1') ; 73,67 (C4') ; 65,42 (C5') ; 58,89 (Ca) ; 57,19 (C2') ; 51,78 (C3') ; 46,61 (Cd) ; 25,48 (Cc) ; 21,38 (Cb)

30 - RMN ^{31}P (U 400 Varian) : δ (ppm) : -2,97 (d, 1P, γP) ; -7,54 (d, 1P, αP) ; -18,56 (m, 1P, βP).

- Spectrométrie de masse (appareil LCQ en mode négatif) : $M - H^- = 925,2 \text{ g.mol}^{-1}$.
- Spectre UV : $\lambda_{\text{max}} = 491 \text{ nm}$.
- Electrophorèse capillaire :
 $\mu_{\text{ep}} = -4,26 \times 10 \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

5

Exemple 13 : Utilisation du morpholino T glycine pour l'analyse d'une séquence d'ADN.

On teste le morpholino T glycine 4 de
10 l'exemple 2 en réaction de séquence avec des amores fluorescentes (Applied Biosystems, Perkin-Elmer, Foster City, CA, USA) sur une matrice standard qui est un ADN plasmidique Bluescript (Stratagene, La Jolla, CA, USA). L'enzyme utilisée est une Taq Polymérase (Perkin-Elmer)
15 que l'on utilise dans son tampon (tampon TACS, Perkin-Elmer).

On effectue deux réactions avec le morpholino T glycine à 200 et 500 μM (tableau 4), ainsi que deux réactions témoins (tableau 5) avec le didésoxynucléotide
20 T (Boehringer).

Le milieu réactionnel d'un volume total de 10 μL contient 125 ng de matrice, 1,25 pmoles d'amorce fluorescente et les autres constituants donnés dans les tableaux 4 et 5. Le milieu est soumis à des cycles thermiques afin de réaliser en nombre des molécules de brins d'ADN néoformés. Une amplification sur un appareil Perkin-Elmer 9700 est réalisée, selon les séquences suivantes : 3 min., 95°C ; 15 cycles (15 sec., 95°C ; 15 sec., 55°C ; 1 min., 70°C) ; 15 cycles (15 sec., 95°C ; 1 min., 70°C). Le produit d'amplification est purifié sur colonne de Sephadex G50.

La migration du produit d'amplification obtenu dans l'éluat de colonne est faite en gel dénaturant (urée 7M) d'acrylamide de type Long Ranger (6%), en TBE 1X, sur un appareil Applied Biosystems 377. L'électrophorèse se déroule pendant 12 heures sous 1500 V.

La préparation de la solution stock de nucléotides représentant ici un mélange des quatre nucléosides triphosphates naturels, appauvri en thymidine triphosphate (appelé dTTP mix) est effectuée de la façon suivante.

On mélange 2µL d'une solution 1,25 mM de dTTP (Promega) avec 2µL de dATP 5 mM (Promega), 2µL de dCTP 5 mM (Promega) et 2 µL de dGTP 5 mM (Promega).

Tableau 4

	Morpholino T glycine 200 µM	Morpholino T glycine 500 µM
Tampon TACS (x5)	2 µL	2 µL
Z1M13 Primer (JOE)	1 µL	1 µL
DTPP mix	1 µL	1 µL
Morpholino T glycine 2 mM	1 µL	2,5 µL
Taq (3U/µL)	1 µL	1 µL
Matrice	1 µL	1 µL
H ₂ O	3 µL	1,5 µL

15

Tableau 5

	ddTTP 250 µM	ddTTP 300 µM
Tampon TACS (x5)	2 µL	2 µL
Z1M13 Primer (ROX)	1 µL	1 µL
DTPP mix	1 µL	1 µL
DdTTP 2,5 mM	1 µL	2,5 µL
Taq (3U/µL)	1 µL	1 µL
Matrice	1 µL	1 µL
H ₂ O	3 µL	1,5 µL

On détecte les produits des réactions de séquence par fluorescence. Les résultats obtenus sont représentés sur la figure annexée qui illustre la détection des produits dans le gel de séquençage analysés par le logiciel Perkin Elmer Analysis, version 3.0.

Pour chaque essai, les primers sont identifiables par leurs propriétés de fluorescence, le marqueur ROX (rouge) pour la réaction de contrôle avec le didésoxythymidine triphosphate 250 µm (courbe en tirets) et le marqueur JOE (vert) pour la réaction concernant la morpholino T glycine 200 µm (courbe en trait plein).

Comme le montre la figure, les résultats de ces tests sont tout à fait concluants puisque le morpholino T glycine est bien incorporé de manière base spécifique par la Taq Polymérase, et agit bien comme un terminateur de chaîne.

Les trois autres morpholino-nucléotides 1, 5 et 6 peuvent être employés de la même manière pour déterminer les positions des quatre bases de l'ADN dans le fragment à analyser.

Exemple 14 : Test des morpholino A putrescine et morpholino A fluorescéine en séquençage.

On teste les morpholino A putrescine (MATPP) 7 et morpholino A fluorescéine (MATPPF) 12 en réaction de séquence avec des amorces fluorescentes (Applied Biosystems, Perkin-Elmer, Foster City, CA, USA) sur une matrice standard qui est un ADN plasmidique Bluescript (Stratagene, La Jolla, CA, USA). L'enzyme utilisée est une Taq Polymérase (Perkin-Elmer) que l'on utilise dans son tampon (tampon Thermo Sequenase, Amersham, Life Science).

On effectue trois réactions de séquence avec le MATPP à 100, 200 et 400 µM et quatre réactions de séquence avec le MATPPF à 200, 500, 1000 et 5000 µM, ainsi que des réactions témoins avec le 5 didésoxynucléotide ddATP à la concentration de 250 µM (Boehringer).

Le milieu réactionnel d'un volume total de 10 µL contient 125 ng de matrice, 1,25 pmoles d'amorce fluorescente et les autres constituants tel que décrit 10 dans les tableaux.

Le milieu est soumis à des cycles thermiques afin de réaliser en nombre des molécules de brins d'ADN néoformés. Une amplification sur un appareil Perkin-Elmer 9700 (Gene Amp®, PCR System 9700) est réalisée, selon les 15 séquences suivantes :

MATPP 7 3 min, 95°C ; 30 cycles (15 sec., 95°C ; 15 sec., 55°C ; 1 min, 70°C)

MATPPF 12 3 min, 95°C ; 30 cycles (15 sec., 95°C ; 15 sec., 55°C ; 4 min, 60°C)

Les produits d'amplification sont purifiés sur colonne de Sephadex G50. Les produits de chaque réaction 20 de séquence sont mélangés aux produits d'une réaction témoin et analysés par électrophorèse.

La migration du mélange obtenu est faite en gel dénaturant (urée 7M) d'acrylamide de type Long Ranger (6%), en TBE 1X, sur un appareil Applied Biosystems 25 377 (ABI Prism DNA Sequencer, Perkin Elmer). L'électrophorèse se déroule pendant 7 heures sous 1680 V, 50 mA.

Préparation de la solution stock de nucléotides : dATP mix pour 16 réactions

30 représentant ici un mélange des quatre nucléotides triphosphates naturels, appauvri en désoxyadénosine

triphosphate (appelé dATP mix) : on mélange 4µL d'une solution 1,25 mM de dATP (Promega) avec 4µL de dTTP 5 mM (Promega), 4µL de dCTP 5 mM (Promega) 4 µL de dGTP 5 mM (Promega).

5

Tableau 6**Préparation du Mix commun pour 15 réactions**

	/réaction	/15 réactions
Tampon TACS (x5)	2 µL	30 µL
dATP mix	1 µL	15 µL
Taq (5U/µL)	1 µL	15 µL
Matrice (plasmide Bluescript)	2 µL	30 µL

Préparation de la solution mère 2mM de MATPP 7 :

- 10 (1,17 mg de MATPP 7 est dilué dans 1,04 ml d'H₂O.

Tableau 7**Réactions avec la morpholino ATPP 2mM**

	Morpholino ATPP 400 µM	Morpholino ATTP 200 µM	Morpholino ATTP 100 µM
Mix commun	6 µL	6 µL	6 µL
Z1M13 Primer (JOE)	1 µL	1 µL	1 µL
Morpholino ATPP 2 mM	2 µL	1 µL	0,5 µL
H ₂ O	1 µL	2 µL	2,5 µL

Tableau 8

Trois réactions de contrôle avec le didésoxyadénosine triphosphate (ddATP) 2,5 mM

5

DdATP 250 µM	
Mix commun	6 µL
Z1M13 Primer (ROX)	1 µL
DdATP 2,5 mM	1 µL
H ₂ O	2 µL

Préparation des solutions mères 20 mM et 2mM de MATPPF 12

10

Solution S₀ à 20 mM : diluer l'échantillon (2,2 mg) dans 110,5 µL d'H₂O

Solution S₁ à 2 mM : prélever 10 µL de S₀ et rajouter 90 µL d'H₂O

15

Tableau 9

Réactions avec la morpholino ATPPF 20 mM (S₀)

	MATPPF 1000 µM	MATPPF 5000 µM
Mix commun	6 µL	6 µL
Z1M13 Primer (JOE)	1 µL	1 µL
Morpholino ATPPF 20 mM	0,5 µL	2,5 µL
H ₂ O	2,5 µL	0,5 µL

20

Tableau 10

Réactions avec la morpholino ATPPF 2 mM (S_1)

	MATPPF 500 μ M	MATTPF 200 μ M
Mix commun	6 μ L	6 μ L
Z1M13 Primer (JOE)	1 μ L	1 μ L
Morpholino ATPPF 2 mM	2,5 μ L	1 μ L
H ₂ O	0,5 μ L	2 μ L

5

Tableau 11

Quatre réactions de contrôle avec le didésoxyadénosine triphosphate (ddATP) 2,5 mM

	ddATP 250 μ M
Mix commun	6 μ L
Z1M13 Primer (ROX)	1 μ L
ddATP 2,5 mM	1 μ L
H ₂ O	2 μ L

10

On donne sur la figure 2 les résultats obtenus avec le morpholino A putrescine 7 à 100 μ M et le morpholino A fluorescéine 12 à 5 mM, entre la 90^{ème} et la 250^{ème} base.

15

On constate donc que ces deux dérivés agissent bien comme des terminateurs de chaîne. De plus, il est à noter que les réactions effectuées avec le dérivé fluorescent, le morpholino A fluorescéine, ont été détectées par le fluorophore porté par ce dérivé : on a donc préparé un terminateur de chaîne fluorescent.

20

Exemple 15 : Utilisation des morpholino A putr scine (MATPP) et morpholino A fluorescéine (MATPPF) pour le marquage matrice-dépendant de fragments d'ADN en 3' ; test de l'incorporation enzymatique de ces composés par 5 trois polymérases (Taq, Klenow, Klenow Exo Free) et une transcriptase inverse.

Ces deux dérivés de nucléosides triphosphates sont testés en incorporation enzymatique pour marquer un oligonucléotide de 13 bases de long en son extrémité 3'.
10 Ce marquage est dit "matrice dépendant" car les enzymes utilisées ont besoin de la cible complémentaire pour allonger l'oligonucléotide selon les règles de Watson & Crick. La séquence A (17870 pmol/mL) étudiée ainsi que sa cible C (16128 pmol/mL) sont données dans la figure ci-
15 dessous :

Cible C : 3'-TGC CAA CCA ACC CCA CCT CAA CCT CTG-5'
Amorce A : 5'-ACG GTT GGT TGG G (13 bp)
Fragments attendus : 5'-ACG GTT TGG GGT GGA (18 bp)
20 et longueurs (bp) : 5'-ACG GTT GGT TGG GGT GGA GTT GGA (24 bp)
5'-ACG GTT GGT TGG GGT GGA GTT GGA GA (26 bp)
5'-ACG GTT GGT TGG GGT GGA GTT GGA GAC (27 bp)

Trois enzymes sont utilisées pour ce marquage :
25 la Taq DNA polymérase (Boehringer Mannheim), la Klenow (Boehringer Mannheim) et la Klenow Exonuclease Free (Amersham Life Science). L'amorce est marquée en son extrémité 5' par incorporation de ^{32}P phosphate avec le kit "Ready to go" T4 Polynucléotide Kinase (Pharmacia Biotech). L'amorce radiomarquée est notée A*.

On prépare les tampons de réaction des trois enzymes pour 10 réactions :

Tableau 12

(en μ L)	Réaction Taq	Réaction Klenow Exo Free
C	50	50
A	10	10
A*	10	10
Tp 10X	50	50
H ₂ O	50	50

Tableau 13

5

(en μ L)	Réaction Klenow
C	50
A	10
A*	10
Tp 5X	100
H ₂ O	0

Les enzymes sont ensuite diluées de la façon suivante, pour 10 réactions :

- 10 - Taq (5U/ μ L) : 10X0,1 μ L de Taq + 10X15,5 μ L d'H₂O
 - Klenow (20U/ μ L) : 10X0,1 μ L de Klenow + 10X15,5 μ L d'H₂O
 - Klenow Exo Free (5U/ μ L) : 10X0,1 μ L de Klenow Exo Free + 10X15,5 μ L d'H₂O.

On prépare également des solutions contenant les nucléosides triphosphates normaux :

- 15 - Solution "2P" composée d'un mélange de dGTP et dTTP à 0,1 mM chacun
 - Solution "4P" composée d'un mélange de dATP, dCTP, dGTP et dTTP à 0,1 mM chacun

Les réactions de mises en œuvres sont décrites 20 dans le tableau 14 suivant :

Tableau 14

Le morpholino A putrescine est ainsi testé à trois concentrations : 400, 200 et 50 µM tandis que le morpholino A fluorescéine est mis en réaction à 2,5 mM, 400, 200 et 50 µM.

5 Avant l'ajout de l'enzyme, le mélange est dénaturné à 94°C pendant 5 minutes. Puis on laisse revenir à température ambiante afin que l'hybridation ait lieu. L'elongation est effectuée à 70°C pour la Taq, 37°C pour les deux Klenow, et ce pendant 10 10 minutes. Enfin, le milieu est à nouveau dénaturné par une solution de formamide et chauffage à 90 °C pendant 5 minutes avant d'être déposé sur un gel de polyacrylamide. La séparation est effectuée par électrophorèse à 2000 V. La lecture du gel est faite au 15 Phosphorimager ; les résultats obtenus sont montrés sur la figure 3.

Sur cette figure, les pistes numéro 1 servent de contrôle de migration de l'oligonucléotide A marqué. Cet oligonucléotide a une longueur de 13 bases 20 (13-mer). Les pistes 2, 3 et 4 permettent de suivre l'allongement de l'oligonucléotide A et l'incorporation du morpholino A putrescine. Dans ces conditions, seuls les nucléotides dGTP et dTTP (solution "2P") ont été ajoutés et sont utilisables par l'enzyme pour procéder 25 à l'extension de l'amorce. La présence du morpholino A putrescine dans le milieu réactionnel permet son incorporation au niveau de la base 18. Un témoin a été effectué, en ne mettant dans le milieu que le mélange "2P" ; dans ce cas, l'enzyme poursuit son extension 30 jusqu'à la 17^{ème} base puisqu'elle n'a pas de dérivé de l'adénosine pour continuer sa polymérisation. Ainsi, la différence de migration entre ce témoin, long de 17 bases, et les réactions 2, 3 et 4 confirme

l'incorporation du MATPP et l'interruption de l'élongation de la chaîne. Les réactions 5 à 8 correspondent aux mêmes réactions avec le morpholino A fluorescéine. Là encore, le MATPPF est bien incorporé et arrête la polymérisation du brin complémentaire. On note toutefois pour les deux Klenow, qu'il y a eu parfois incorporation d'une autre base (G ou T) à la place du dérivé morpholino. En effet, on trouve dans ces cas des produits d'élongation, correspondant aux 10 18- et 24-mer.

Le puits 9 (voir figure 4) est une réaction de contrôle : le milieu réactionnel contient les 4 désoxynucléotides normaux et peut de ce fait allonger l'amorce jusqu'à son extension maximale, c'est-à-dire 15 jusqu'à obtention du 27-mer.

En conclusion, les trois enzymes incorporent le morpholino A putrescine et le morpholino A fluorescéine dans toutes les concentrations testées, y compris aux plus faibles concentrations.

La capacité des transcriptases inverses à incorporer les dérivés morpholinonucléotides au cours de l'extension d'oligonucléotides a été confirmée. Dans ce test, la transcriptase inverse (M-MLV, Promega ; activité : 200 000 U/mL) est choisie comme modèle. 25 Cette dernière est capable de synthétiser un brin d'ADN complémentaire d'une cible (ADN ou ARN), à partir d'une amorce oligonucléotide, en présence de nucléosides triphosphates. On teste donc les morpholino A putrescine et morpholino A fluorescéine à des 30 concentrations finales de 250 µM. Une copie de contrôle est aussi déposée sur le gel, avec les quatre nucléosides triphosphates de la solution "4P".

La séquence de la cible C (27-mer, 16128 pmol/mL) est celle de l'amorce B (14-mer, 56368 pmol/mL) sont montrées ci-dessous. Cette amorce B, marquée de façon radioactive est notée B*.

5 La solution B* contient alors 10 pmol de l'amorce B dans un volume de 50 µL. On dilue également les solutions de C et B dix fois ; ces solutions sont notées respectivement C/10 et B/10.

10 Cible C : 3'-TGC CAA CCA ACC CCA CCT CAA CCT CTG-5'
Amorce B : 5'-ACG GTT GGT TGG GG (14 bp)

Tableau 15

15

(en µL)	Réaction 1	Réaction 2	Réaction 3	Réaction 4
C/10	2	2	2	0
B*	5	5	5	5
B/10	3	3	3	0
Tampon 5X	4	4	4	0
MATPP 2 mM	2,5	0	0	0
MATPPP 2 mM	0	2,5	0	0
"2P"	2,5	2,5	0	0
"4P"	0	0	2,5	0
H ₂ O	0	0	0	15
Enzyme	1	1	1	0

Comme précédemment, le mélange est dénaturé, avant l'ajout de l'enzyme, à 94°C pendant 5 minutes et on laisse revenir à température ambiante.

20 L'élongation se fait à 37°C pendant 60 minutes. Le milieu est dénaturé par une solution de formamide et chauffage à 90 °C pendant 5 minutes avant d'être déposé sur un gel de polyacrylamide. La séparation se fait par électrophorèse à 1500 V. La lecture du gel est faite au

Phosphorimager ; les résultats obtenus sont donnés sur la figure 4.

Sur cette figure, la piste 4 permet d'estimer la longueur de l'amorce B marquée. La piste 5 3 montre l'allongement maximal de l'amorce B jusqu'à un produit final de 27 paires de bases en présence des 4 désoxynucléotides naturels. Les réactions 1 et 10 2 montrent que les dérivés morpholino sont incorporés au cours de l'elongation de l'amorce B par la transcriptase inverse. Cette incorporation est quantitative et fournit un produit de 18 paires de bases (en absence de dérivé morpholino, l'extension est bloquée à la 17^{ème} base).

En conclusion, les dérivés morpholino sont 15 très bien reconnus par la transcriptase inverse et incorporés dans les amorces en cours d'allongement selon un processus base spécifique.

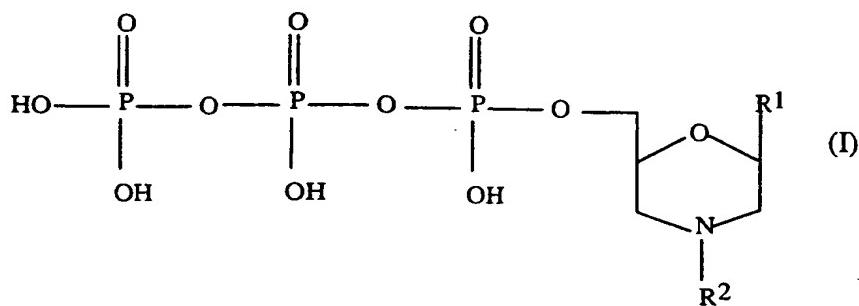
Références citées

20

- [1] : Sanger et al, Proceedings of National Academy of Science, 74, 1977, p. 5463-5467.
- [2] : WO-A-96/23807.
- [3] : Prober et al, Science, 238, 1987, pages 336-341.
- 25 [4] : Hileman et al, Bioconjugate Chemistry, 5, 1994, pages 436-444.
- [5] : Broker et al, Nucleic Acids Research, 5, 1978, pages 363-385.
- [6] : Agrawal et al, Nucleic Acids Research, 14, 1986, 30 pages 6227-6245.
- [7] : FR-A-2 710 068
- [8] : Rayford et al, Journal of Biological Chemistry, 260, 1985, pages 15708-15713.

REVENDICATIONS

1. Procédé de fabrication d'un fragment d'acide nucléique (ADN ou ARN) marqué en 3', qui comprend l'incorporation enzymatique d'un dérivé de nucléotide ayant pour précurseur un composé de formule :

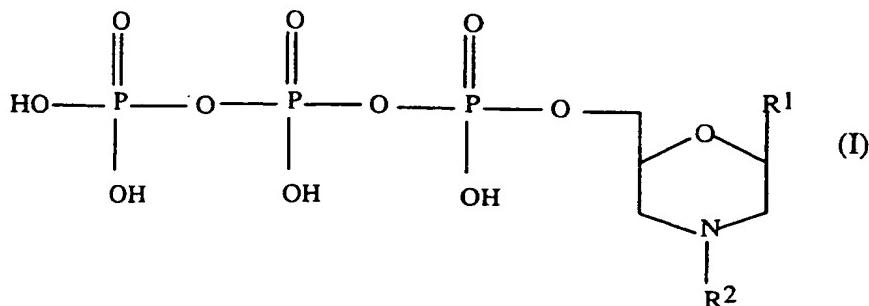


10 dans laquelle R¹ représente une base nucléique et R² représente un groupe répondant à l'une des formules suivantes :

- | | | |
|----|--|--|
| | - (CH ₂) _n -NH ₂ | - (CH ₂) _n -SH |
| | - (CH ₂) _n -COOH | - (CH ₂) _n -OH |
| 15 | - (CH ₂) _n -NH-R ³ | - (CH ₂) _n -SR ³ |
| | - (CH ₂) _n -CO-R ³ | - (CH ₂) _n -OR ³ |

15 dans lesquelles n est un nombre entier allant de 1 à 12 et R³ est un groupe dérivé d'un marqueur, d'une protéine, d'une enzyme, d'un acide gras ou d'un 20 peptide, à l'extrémité 3' OH du fragment d'acide nucléique.

2. Procédé de modification d'un fragment d'acide nucléique par incorporation enzymatique en 3' d'un morpholino-nucléotide modifié ayant pour précurseur un composé répondant à la formule :

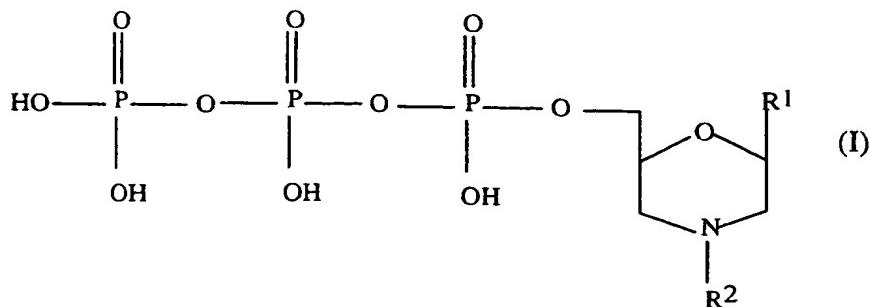


dans laquelle R¹ représente une base nucléique et R² représente un groupe répondant à l'une des formules suivantes :

- 5 - (CH₂)_n-NH-R³
- (CH₂)_n-CO-R³
- (CH₂)_n-SR³
- (CH₂)_n-OR³

10 dans lesquelles R³ représente un composé choisi parmi les photoréticulants, les acides gras, les peptides hydrophobes, les anticorps, les enzymes et les fluorophores.

15 3. Procédé de séquençage d'un acide nucléique (ADN ou ARN) par la technique de polymérisation enzymatique de la séquence complémentaire de cet acide nucléique en utilisant des terminateurs de chaînes, dans lequel au moins l'un des terminateurs de chaînes a pour précurseur un composé 20 répondant à la formule :



dans laquelle R¹ représente une base nucléique et R² représente un groupe répondant à l'une des formules suivantes :

5	- (CH ₂) _n -NH ₂	- (CH ₂) _n -SH
	- (CH ₂) _n -COOH	- (CH ₂) _n -OH
	- (CH ₂) _n -NH-R ³	- (CH ₂) _n -SR ³
	- (CH ₂) _n -CO-R ³	- (CH ₂) _n -OR ³

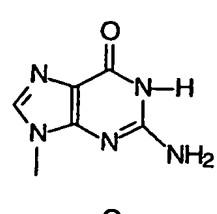
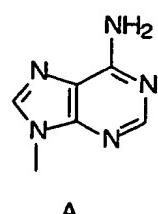
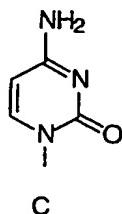
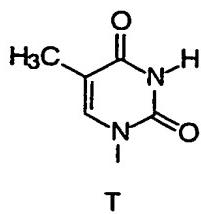
10 dans lesquelles n est un nombre entier allant de 1 à 12 et R³ est un groupe dérivé d'un marqueur, d'une protéine, d'une enzyme, d'un acide gras ou d'un peptide.

15 4. Procédé selon la revendication 1, 2 ou 3, dans lequel l'enzyme est le fragment de Klenow de l'ADN polymérase.

20 5. Procédé selon la revendication 1, 2 ou 3, dans lequel l'enzyme est une polymérase thermorésistante d'une bactérie Thermophile ou la terminale transférase ou la transcriptase inverse.

25 6. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, dans lequel la base nucléique est une base nucléique naturelle choisie parmi l'adénine, la guanine, la cytosine, la thymine, l'uracile, la xanthine, l'hypoxanthine, la 2-aminopurine et leurs dérivés.

30 7. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, dans lequel R¹ répond à l'une de formules suivantes :



8. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, dans lequel le marqueur est choisi parmi les produits radioactifs, les produits luminescents, électroluminescents et fluorescents, les molécules capables de se coupler à d'autres molécules, les molécules autorisant des interactions du type antigène-anticorps, et les marqueurs enzymatiques.

10

9. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, dans lequel R³ est un fluorophore.

15

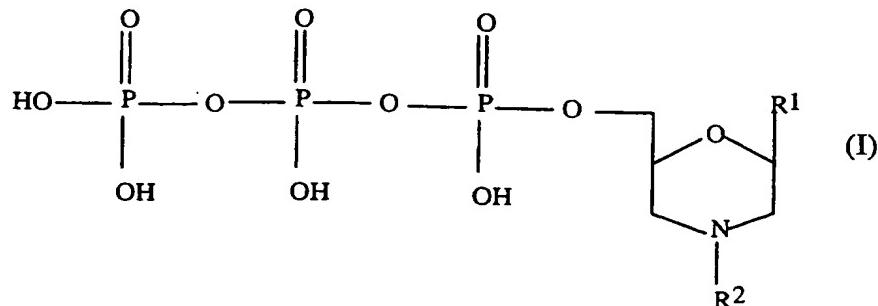
10. Procédé selon la revendication 9, dans lequel R³ est choisi parmi les dérivés de la fluorescéine, de la biotine et de la rhodamine.

20

11. Procédé selon la revendication 1, 2 ou 3 dans lequel le dérivé, le morpholino-nucléotide modifié, ou le terminateur de chaîne est le composé (I) sous forme de monophosphate.

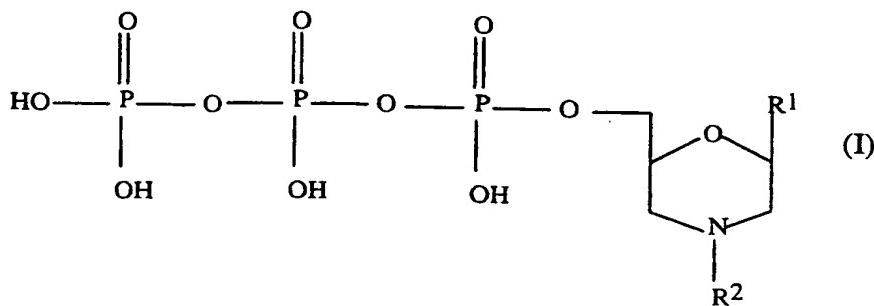
25

12. Morpholino-nucléotide répondant à la formule :



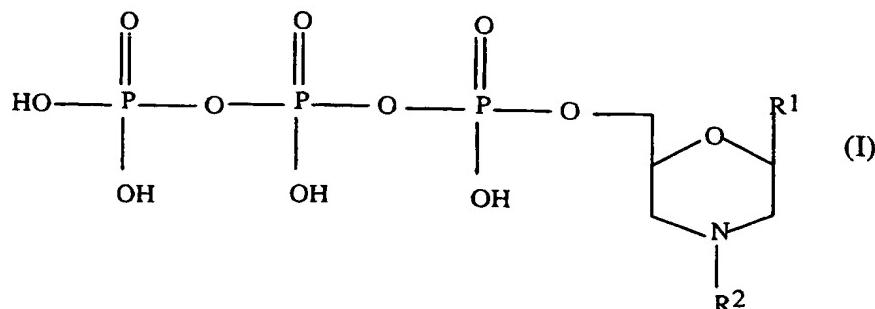
5 dans laquelle R¹ est l'adénine et R² représente -CH₂-COOH, -(CH₂)₄-NH₂ ou -(CH₂)₄-NH-R³ avec R³ représentant un groupe dérivé de la fluorescéine.

13. Morpholino-nucléotide de formule :



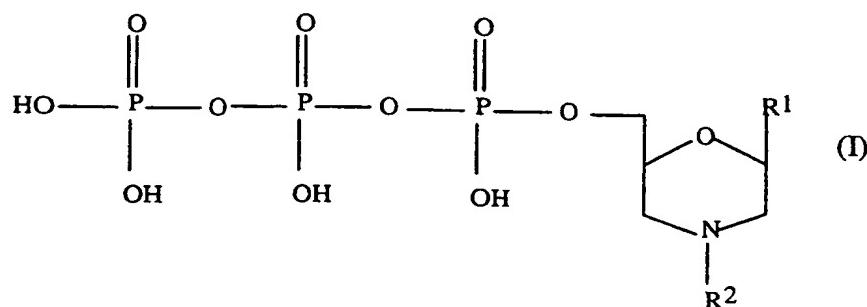
10 dans laquelle R¹ est la thymine et R² représente -CH₂-COOH, -(CH₂)₄-NH₂ ou -(CH₂)₄-NH-R³ avec R³ représentant un groupe dérivé de la fluorescéine.

15 14. Morpholino-nucléotide répondant à la formule :



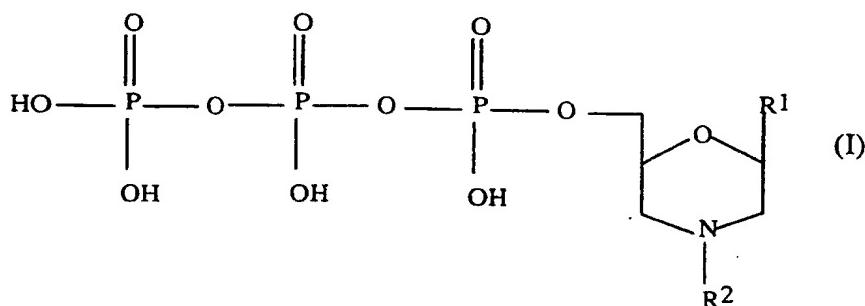
dans laquelle R¹ est la cytosine et R² représente -CH₂-COOH, -(CH₂)₄-NH₂ ou -(CH₂)₄-NH-R³ avec R³ représentant un groupe dérivé de la fluorescéine.

5 15. Morpholino-nucléotide répondant à la formule :



10 dans laquelle R¹ est la guanine et R² représente -CH₂-COOH, -(CH₂)₄-NH₂ ou -(CH₂)₄-NH-R³ avec R³ représentant un groupe dérivé de la fluorescéine.

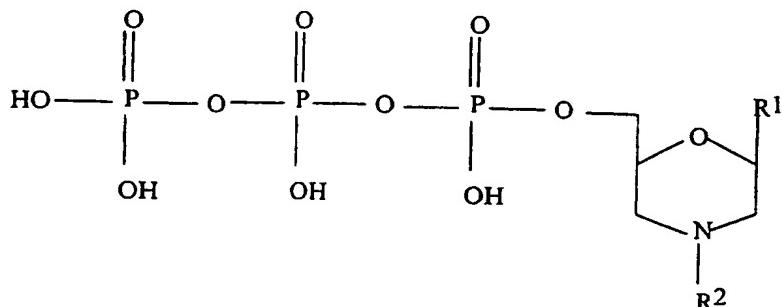
15 16. Procédé de fabrication d'un morpholino-nucléotide de formule :



dans laquelle R¹ représente une base nucléique et R² représente un groupe répondant à l'une des formules suivantes :

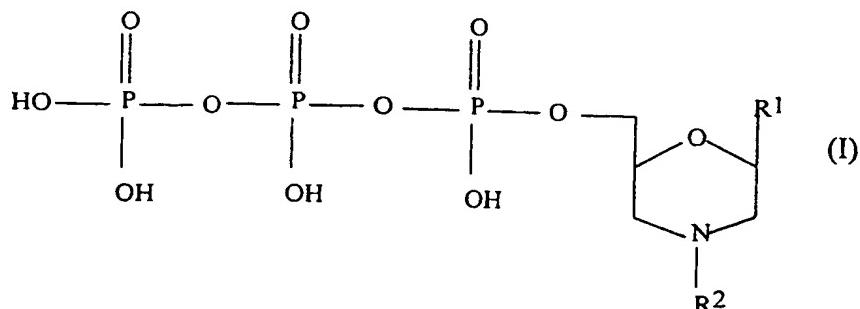
- | | | |
|----|--|--|
| 20 | - (CH ₂) _n -NH ₂ | - (CH ₂) _n -SH |
| | - (CH ₂) _n -COOH | - (CH ₂) _n -OH |
| | - (CH ₂) _n -NH-R ³ | - (CH ₂) _n -SR ³ |
| | - (CH ₂) _n -CO-R ³ | - (CH ₂) _n -OR ³ |

dans lesquelles n est un nombre entier allant de 1 à 12 et R³ est un groupe dérivé d'un marqueur, d'une protéine, d'une enzyme, d'un acide gras ou d'un peptide, la réaction d'un nucléoside triphosphate de 5 formule :



10 dans laquelle R¹ a la signification donnée ci-dessus, avec un periodate, un composé de formule R² NH₂ dans laquelle R² a la signification donnée ci-dessus et du boroxydrure de sodium.

15 17. Utilisation d'un morpholino-nucléotide de formule :



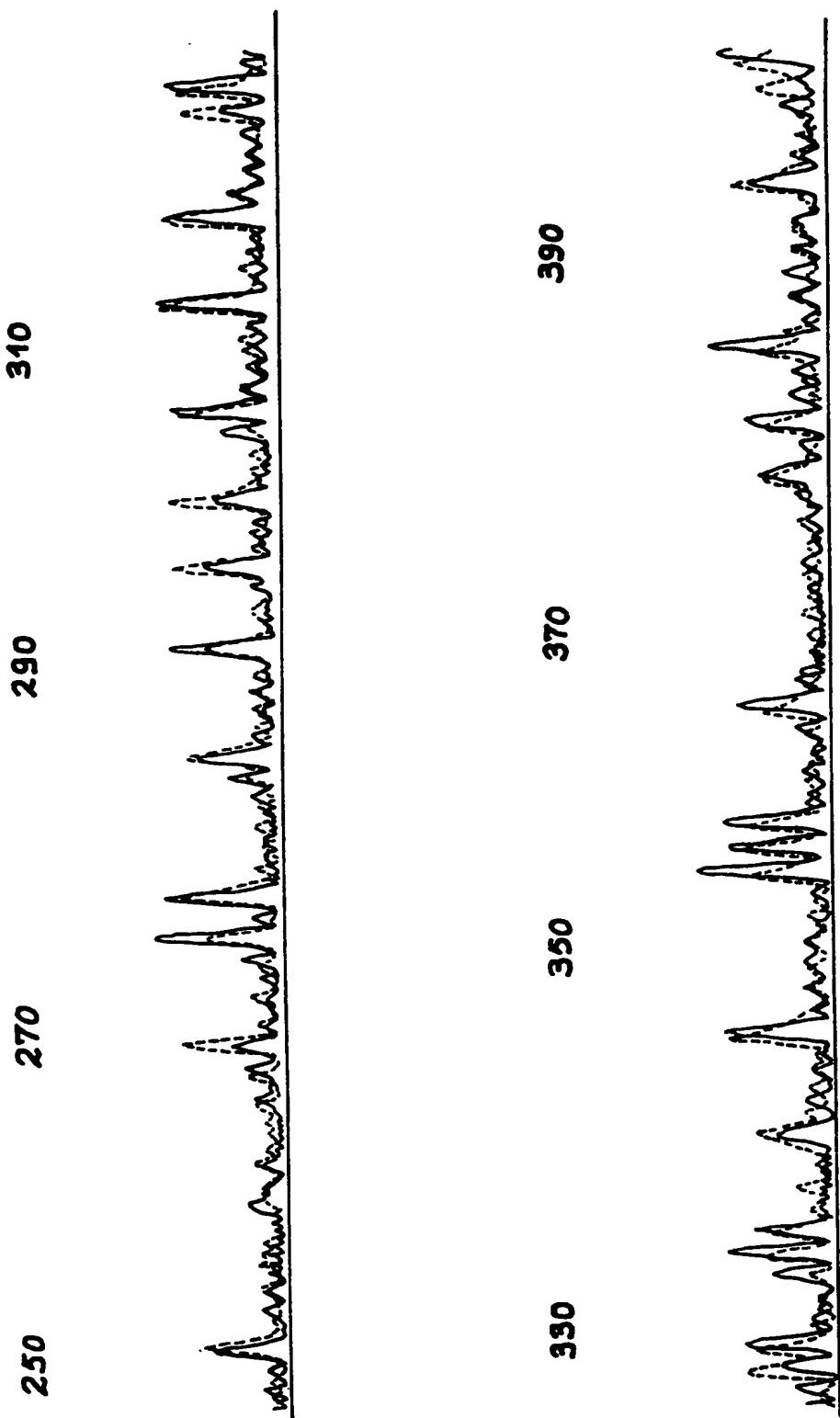
dans laquelle R¹ représente une base nucléique et R² représente un groupe répondant à l'une des formules suivantes :

20

- | | |
|--|--|
| - (CH ₂) _n -NH ₂ | - (CH ₂) _n -SH |
| - (CH ₂) _n -COOH | - (CH ₂) _n -OH |
| - (CH ₂) _n -NH-R ³ | - (CH ₂) _n -SR ³ |
| - (CH ₂) _n -CO-R ³ | - (CH ₂) _n -OR ³ |

dans lesquelles n est un nombre entier allant de 1 à 12 et R³ est un groupe dérivé d'un marqueur, d'une protéine, d'une enzyme, d'un acide gras ou d'un peptide, pour le marquage de fragments d'ADN ou d'ARN.

FIG. 1



THIS PAGE BLANK (USPTO)

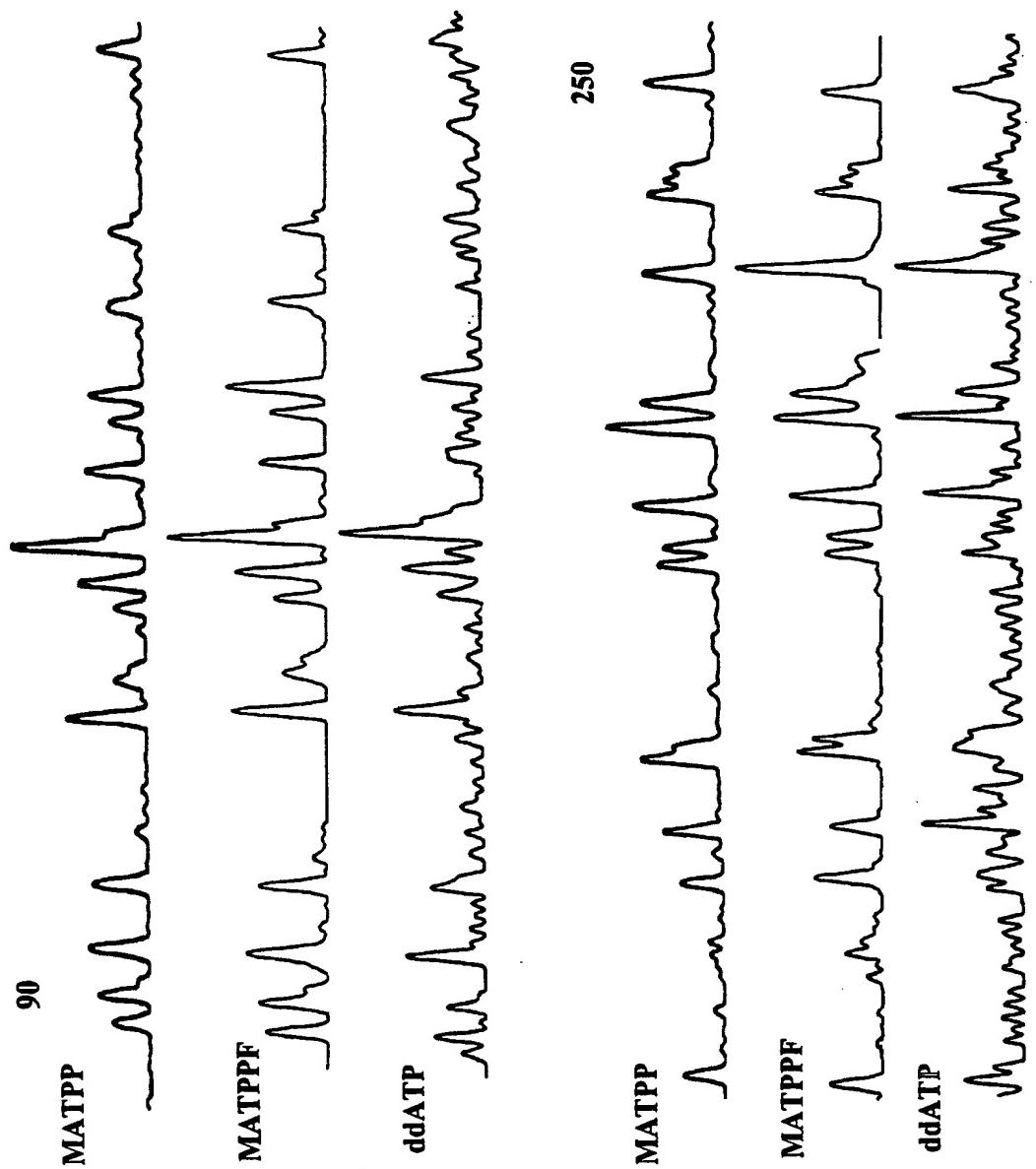


FIG. 2

THIS PAGE BLANK (USPTO)

FIG. 3

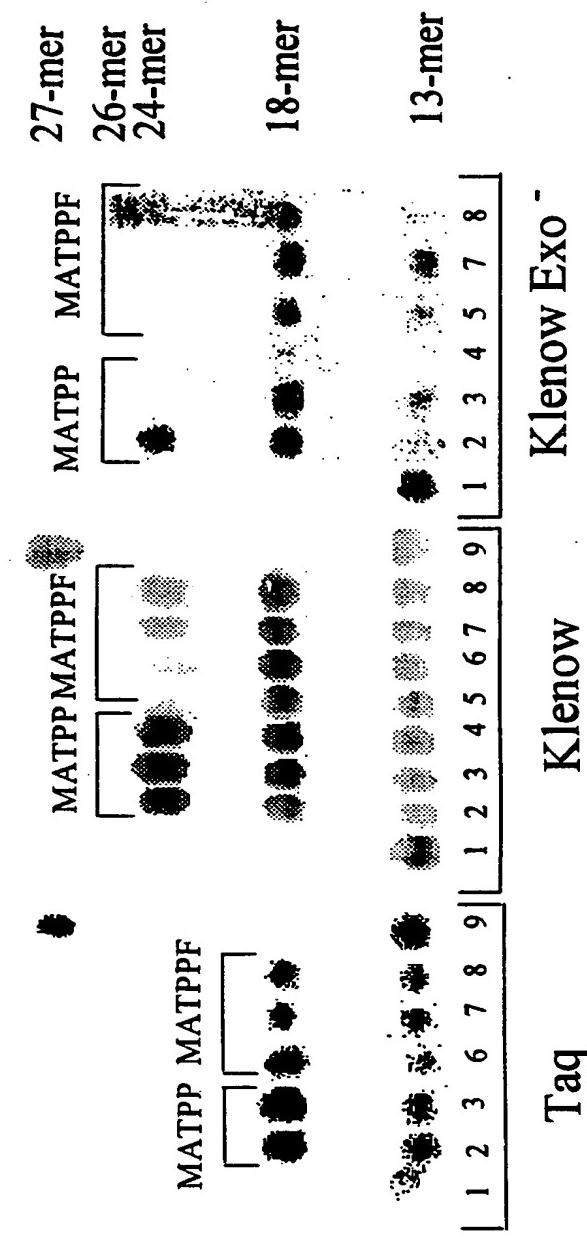


FIG. 4

Taq Klenow -
Klenow Exo -

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 00/00427

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12P19/34 C12Q1/68

C07H21/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12P C12Q C07H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 95 07907 A (COMMISSARIAT ENERGIE ATOMIQUE ;CENTRE NAT ETD SPATIALES (FR); MOLK) 23 March 1995 (1995-03-23) *abstract* *figs. of pages 4, 14 and 15*. *claims 1, 4 and 8*. —/—	12-17
X	US 4 515 781 A (TORRENCE PAUL F ET AL) 7 May 1985 (1985-05-07) column 3; figure I column 4, line 31 -column 5, line 29 column 5, line 61 - line 66 —/—	12-17

 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

21 June 2000

28/06/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5018 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Mata Vicente, T.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 00/00427

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>BROWN ET AL.: "The Reduction of the Adduct of Periodate-oxidised Adenosine-5' Phosphate and Methylamine." J. CHEM. SOC., 1965, pages 5072-5073, XP002121978 page 5072</p>	16
X	<p>GIRAUT ET AL.: "Use of Morpholinonucleosides to Conjugate Oxidised DNA Bases to Proteins." BIOCONJUGATE CHEM., vol. 7, 1996, pages 445-450, XP002121979 page 445; figure 1 page 448; figure 2</p>	16
P,X	<p>MARCIACQ ET AL.: "Synthesis and enzymatic incorporation of Morpholino thymidine-5'-triphosphate in DNA fragments." TETRAHEDRON LETT., vol. 40, 18 June 1999 (1999-06-18), pages 4673-4676, XP004167188 page 4673 -page 4674; figure 1</p>	1-7, 11-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 00/00427

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9507907	A 23-03-1995	FR 2710068	A	24-03-1995
		DE 69415030	D	14-01-1999
		DE 69415030	T	10-06-1999
		EP 0719265	A	03-07-1996
		JP 9506858	T	08-07-1997
		US 5721341	A	24-02-1998
US 4515781	A 07-05-1985	JP 1053880	B	15-11-1989
		JP 1575633	C	24-08-1990
		JP 59205394	A	20-11-1984

THIS PAGE BLANK (USPTO)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Date Internationale No
PCT/FR 00/00427

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 C12P19/34 C12Q1/68 C07H21/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 7 C12P C12Q C07H

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 95 07907 A (COMMISSARIAT ENERGIE ATOMIQUE ;CENTRE NAT ETD SPATIALES (FR); MOLK) 23 mars 1995 (1995-03-23) *Résumé* *Figs. des pages 4, 14 and 15*. *Revendications 1, 4 and 8.* —	12-17
X	US 4 515 781 A (TORRENCE PAUL F ET AL) 7 mai 1985 (1985-05-07) colonne 3; figure I colonne 4, ligne 31 -colonne 5, ligne 29 colonne 5, ligne 61 - ligne 66 — -/—	12-17

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

21 juin 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

28/06/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Mata Vicente, T.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Document International No
PCT/FR 00/00427

C(uite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	BROWN ET AL.: "The Reduction of the Adduct of Periodate-oxidised Adenosine-5' Phosphate and Methylamine." J. CHEM. SOC., 1965, pages 5072-5073, XP002121978 page 5072	16
X	GIRAUT ET AL.: "Use of Morpholinonucleosides to Conjugate Oxidised DNA Bases to Proteins." BIOCONJUGATE CHEM., vol. 7, 1996, pages 445-450, XP002121979 page 445; figure 1 page 448; figure 2	16
P,X	MARCIACQ ET AL.: "Synthesis and enzymatic incorporation of Morpholino thymidine-5'-triphosphate in DNA fragments." TETRAHEDRON LETT., vol. 40, 18 juin 1999 (1999-06-18), pages 4673-4676, XP004167188 page 4673 -page 4674; figure 1	1-7, 11-17

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Date de Internationale No

PCT/FR 00/00427

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9507907 A	23-03-1995	FR 2710068 A DE 69415030 D DE 69415030 T EP 0719265 A JP 9506858 T US 5721341 A	24-03-1995 14-01-1999 10-06-1999 03-07-1996 08-07-1997 24-02-1998
US 4515781 A	07-05-1985	JP 1053880 B JP 1575633 C JP 59205394 A	15-11-1989 24-08-1990 20-11-1984

THIS PAGE BLANK (USPTO)

La demande d'examen préliminaire international doit être présentée directement à l'administration chargée de l'examen préliminaire international qui est compétente ou, si plusieurs administrations sont compétentes, à l'une d'entre elles, au choix du déposant. Le déposant peut indiquer le nom complet ou le code à deux lettres de cette administration au dessus de la ligne qui suit :

IPEA/

PCT

CHAPITRE II

DEMANDE D'EXAMEN PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL

selon l'article 31 du Traité de coopération en matière de brevets :

Le soussigné requiert que la demande internationale spécifiée ci-après fasse l'objet d'un examen préliminaire international conformément au Traité de coopération en matière de brevets et fait élection de tous les États éligibles sauf indication contraire.

Réserve à l'administration chargée de l'examen préliminaire international

Administration chargée de l'examen préliminaire international		Référence du dossier du déposant ou du mandataire B 13405.3 MDT	
Cadre n° I IDENTIFICATION DE LA DEMANDE INTERNATIONALE			
Demande internationale n° PCT/FR00/00427	Date du dépôt international (<i>jour/mois/année</i>) 21 février 2000 (21.02.00)	Date de priorité (<i>la plus ancienne</i>) (<i>jour/mois/année</i>) 22 février 1999 (22.02.99)	
Titre de l'invention PROCEDE DE FABRICATION DE MORPHOLINO-NUCLEOTIDES, ET LEUR UTILISATION POUR L'ANALYSE ET LE MARQUAGE DE SEQUENCES D'ACIDES NUCLEIQUES			
Cadre n° II DÉPOSANT(S)			
Nom et adresse : (<i>Nom de famille suivi du prénom, pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays.</i>) COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE 31-33 rue de la Fédération 75752 PARIS 15ème FRANCE		n° de téléphone 01 69 08 82 93	
		n° de télécopieur 01 69 08 82 92	
		n° de télémprimateur	
Nationalité (nom de l'État) : FR	Domicile (nom de l'État) : FR		
Nom et adresse : (<i>Nom de famille suivi du prénom, pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays.</i>) CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE 3, rue Michel Ange 75794 PARIS CEDEX 16 FRANCE			
Nationalité (nom de l'État) : FR	Domicile (nom de l'État) : FR		
Nom et adresse : (<i>Nom de famille suivi du prénom, pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays.</i>) MARCIAQ Florence 6, rue Gambetta 13580 LA FARE LES OLIVIERS FRANCE			
Nationalité (nom de l'État) : FR	Domicile (nom de l'État) : FR		
<input checked="" type="checkbox"/> D'autres déposants sont indiqués sur une feuille annexe.			

Formulaire PCT/IPEA/401 (première feuille) (juillet 1998; réimpression janvier 2000)

Voir les notes relatives au formulaire de demande d'examen préliminaire international

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Suite du cadre n° II DÉPOSANT(S)

Si aucun des sous-cadres suivants n'est utilisé, cette feuille ne doit pas être incluse dans la demande d'examen préliminaire international

Nom et adresse : *(Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays.)*

SAUVAIGO Sylvie
Le Noyaret
38320 HERBEYS
FRANCE

Nationalité (nom de l'État) : FR

Domicile (nom de l'État) : FR

Nom et adresse : *(Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays.)*

MOURET Jean-François
Montée du Pilet
38500 COUBLEVIE
FRANCE

Nationalité (nom de l'État) : FR

Domicile (nom de l'État) : FR

Nom et adresse : *(Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays.)*

ISSARTEL Jean-Paul
9, rue du Fournet
38120 SAINT-EGREVE
FRANCE

Nationalité (nom de l'État) : FR

Domicile (nom de l'État) : FR

Nom et adresse : *(Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays.)*

MOLKO Didier
Les Noyers A1.1
11 avenue de la Gare
38210 TULLINS
FRANCE

Nationalité (nom de l'État) : FR

Domicile (nom de l'État) : FR



D'autres déposants sont indiqués sur une autre feuille annexe.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Cadre n° III MANDATAIRE OU REPRÉSENTANT COMMUN; OU ADRESSE POUR LA CORRESPONDANCE

La personne indiquée ci-dessous est mandataire représentant commun
 et a été désignée à une date antérieure; elle représente aussi le ou les déposants pour l'examen préliminaire international.
 est désignée par la présente; toute désignation antérieure de mandataires ou d'un représentant commun est de ce fait révoquée.
 est désignée par la présente, spécialement pour la procédure devant l'administration chargée de l'examen préliminaire international, en sus du ou des mandataires ou du représentant commun désignés antérieurement.

Nom et adresse : (<i>Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays.</i>)	n° de téléphone 01 53 83 94 00
BREVATOME 3, rue du Docteur Lancereaux 75008 PARIS FRANCE	n° de télécopieur 01 45 63 83 33
	n° de télémétreur

Adresse pour la correspondance : cocher cette case lorsque aucun mandataire ni représentant commun n'est ou n'a été désigné et que l'espace ci-dessus est utilisé pour indiquer une adresse spéciale à laquelle la correspondance doit être envoyée.

Cadre n° IV BASE DE L'EXAMEN PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL

Déclaration concernant les modifications :

1. Le déposant souhaite que l'examen préliminaire international commence sur la base suivante :

la demande internationale telle qu'elle a été déposée initialement
 la description telle qu'elle a été déposée initialement
 telle qu'elle a été modifiée en vertu de l'article 34
 les revendications telles qu'elles ont été déposées initialement
 telles qu'elles ont été modifiées en vertu de l'article 19 (avec, le cas échéant, la déclaration jointe aux modifications)
 telles qu'elles ont été modifiées en vertu de l'article 34
 les dessins tels qu'ils ont été déposés initialement
 tels qu'ils ont été modifiés en vertu de l'article 34

2. Le déposant souhaite que les modifications apportées aux revendications en vertu de l'article 19 soient considérées comme écartées.

3. Le déposant souhaite que le commencement de l'examen préliminaire international soit différé jusqu'à l'expiration d'un délai de 20 mois à compter de la date de priorité, à moins que l'administration chargée de l'examen préliminaire international ne reçoive une copie des modifications effectuées en vertu de l'article 19 ou une déclaration du déposant, aux termes de laquelle celui-ci ne souhaite pas effectuer de modifications en vertu de l'article 19 (règle 69.1.d)). (*Ne pas cocher cette case lorsque le délai visé à l'article 19 a expiré.*)

- * Lorsque aucune case n'est cochée, l'examen préliminaire international commencera sur la base de la demande internationale telle qu'elle a été déposée initialement ou, si l'administration chargée de l'examen préliminaire international reçoit copie des modifications apportées aux revendications en vertu de l'article 19 ou des modifications apportées à la demande internationale en vertu de l'article 34 avant d'avoir commencé à rédiger une opinion écrite ou le rapport d'examen préliminaire international, sur la base de la demande internationale ainsi modifiée.

Langue : l'examen préliminaire international sera effectué en Français, qui est

- la langue dans laquelle la demande internationale a été déposée.
 la langue d'une traduction remise aux fins de la recherche internationale.
 la langue de publication de la demande internationale.
 la langue de la traduction (qui va être) remise aux fins de l'examen préliminaire international.

Cadre n° V ÉLECTION D'ÉTATS

Le déposant élit tous les États éligibles (*c'est-à-dire tous les États qui ont été désignés et qui sont liés par le chapitre II du PCT*)
 à l'exclusion des États ci-après que le déposant souhaite ne pas élire :

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Cadre n° VI BORDEREAU

Aux fins de l'examen préliminaire international, les éléments suivants, établis dans la langue indiquée au cadre n° IV, sont joints à la présente demande d'examen :

- | | | |
|--|---|----------|
| 1. traduction de la demande internationale | : | feuilles |
| 2. modifications selon l'article 34 | : | feuilles |
| 3. copie (ou, si elle est exigée, traduction) des modifications selon l'article 19 | : | feuilles |
| 4. copie (ou, si elle est exigée, traduction) de la déclaration selon l'article 19 | : | feuilles |
| 5. lettre | : | feuilles |
| 6. autres pièces (<i>préciser</i>) | : | feuilles |

Réservé à l'administration chargée de l'examen préliminaire international

reçu	non reçu
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Le ou les éléments cochés ci-après sont aussi joints à la demande d'examen préliminaire international :

- | | |
|---|--|
| 1. <input checked="" type="checkbox"/> feuille de calcul des taxes | 4. <input type="checkbox"/> explication de l'absence d'une signature |
| 2. <input type="checkbox"/> pouvoir distinct signé | 5. <input type="checkbox"/> listage des séquences de nucléotides ou d'acides aminés sous forme déchiffrable par ordinateur |
| 3. <input type="checkbox"/> copie du pouvoir général; numéro de référence, le cas échéant : | 6. <input type="checkbox"/> autres éléments (<i>préciser</i>) : |

Cadre n° VII SIGNATURE DU DÉPOSANT, DU MANDATAIRE OU DU REPRÉSENTANT COMMUN

À côté de chaque signature, indiquer le nom du signataire et, si cela n'apparaît pas clairement à la lecture de la demande d'examen préliminaire international, à quel titre l'intéressé signe.


R. SIGNORE

Réservé à l'administration chargée de l'examen préliminaire international

- | | | |
|--|--|--|
| 1. Date effective de réception de la DEMANDE D'EXAMEN PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL : | | |
| 2. Date modifiée de réception de la demande d'examen préliminaire international, en cas de CORRECTIONS apportées en vertu de la règle 60.1.b) : | | |
| 3. <input type="checkbox"/> La demande d'examen préliminaire international a été reçue PLUS DE 19 mois après la date de priorité et les points 4 et 5 ne sont pas applicables. | <input type="checkbox"/> Le déposant a été informé en conséquence. | |
| 4. <input type="checkbox"/> La demande d'examen préliminaire international a été reçue dans le délai de 19 mois à compter de la date de priorité, prorogé en vertu de la règle 80.5. | | |
| 5. <input type="checkbox"/> Bien que la demande d'examen préliminaire international ait été reçue plus de 19 mois après la date de priorité, le retard à l'arrivée est EXCUSÉ en vertu de la règle 82. | | |

Réservé au Bureau international

Demande d'examen préliminaire international reçue de l'administration chargée de l'examen préliminaire international le :

THIS PAGE BLANK (USPTO)

CHAPITRE II

PCT

FEUILLE DE CALCUL DES TAXES

Annexe de la demande d'examen préliminaire international

<p>Demande internationale n° PCT/FR00/00427</p> <p>Référence du dossier du déposant ou du mandataire B 13405.3 MDT</p> <p>Déposant Commissariat à l'Energie Atomique-Centre National de la Recherche Scientifique-MARCIAQ Florence-SAUVAIGO Sylvie-MOURET Jean-François- ISSARTEL Jean-Paul-MOLKO Didier</p>	<p style="text-align: center;">Réservé à l'administration chargée de l'examen préliminaire international</p> <p style="text-align: center;">Timbre à date de l'administration chargée de l'examen préliminaire international</p>								
<p>Calcul des taxes prescrites</p> <p>1. Taxe d'examen préliminaire 1 533 Euros P</p> <p>2. Taxe de traitement (<i>Les déposants de certains États ont droit à une réduction de 75% de la taxe de traitement. Lorsque le déposant a (ou tous les déposants ont) droit à cette réduction, le montant devant figurer sous H est égal à 25% de la taxe de traitement.</i>) 148 Euros H</p> <p>3. Total des taxes prescrites <i>Additionner les montants portés dans les cadres P et H et inscrire le résultat dans le cadre TOTAL</i> 1 681 Euros TOTAL</p>									
<p>Mode de paiement</p> <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> <input checked="" type="checkbox"/> autorisation de débiter un compte de dépôt auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir plus bas)</td> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> <input type="checkbox"/> espèces <input type="checkbox"/> timbres fiscaux <input type="checkbox"/> coupons <input type="checkbox"/> autre (<i>préciser</i>): _____ </td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/> chèque</td> <td></td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/> mandat postal</td> <td></td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/> traite bancaire</td> <td></td> </tr> </table>		<input checked="" type="checkbox"/> autorisation de débiter un compte de dépôt auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir plus bas)	<input type="checkbox"/> espèces <input type="checkbox"/> timbres fiscaux <input type="checkbox"/> coupons <input type="checkbox"/> autre (<i>préciser</i>): _____	<input type="checkbox"/> chèque		<input type="checkbox"/> mandat postal		<input type="checkbox"/> traite bancaire	
<input checked="" type="checkbox"/> autorisation de débiter un compte de dépôt auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir plus bas)	<input type="checkbox"/> espèces <input type="checkbox"/> timbres fiscaux <input type="checkbox"/> coupons <input type="checkbox"/> autre (<i>préciser</i>): _____								
<input type="checkbox"/> chèque									
<input type="checkbox"/> mandat postal									
<input type="checkbox"/> traite bancaire									
<p>Autorisation concernant un compte de dépôt (<i>les administrations chargées de l'examen préliminaire international ne permettent pas toutes l'utilisation de ce mode de paiement</i>)</p> <p>L'administration chargée de l'examen préliminaire international/ _____ <input checked="" type="checkbox"/> est autorisée à débiter mon compte de dépôt du total des taxes indiqué ci-dessus.</p> <p><input type="checkbox"/> (<i>cette case ne peut être cochée que si les conditions relatives aux comptes de dépôt établies par l'administration chargée de l'examen préliminaire international le permettent</i>) est autorisée à débiter mon compte de dépôt de tout montant manquant – ou à le créditer de tout excédent – dans le paiement du total des taxes indiqué ci-dessus.</p>									
2804.0035	08 août 2000								
Numéro du compte de dépôt	Date (jour/mois/année)	Signature							

THIS PAGE BLANK (USP, U)